



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“MUTACIONES Y POLIMORFISMOS MITOCONDRIALES EN PACIENTES
MEXICANOS CON CÁNCER DE PRÓSTATA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA
VICTORIA EDWINA CAMPOS GARCIA**

ASESOR:

Dr. J. Francisco Montiel Sosa

Co-ASESORA:

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Mutaciones y polimorfismos mitocondriales en pacientes mexicanos con cáncer de próstata

Que presenta la pasante: Victoria Edwina Campos Garcia

Con número de cuenta: 409015124 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Noviembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------|-----------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. José Francisco Montiel Sosa | |
| VOCAL | QFB. Rosalba Bonilla Sánchez | |
| SECRETARIO | Dr. Andrés Romero Rojas | |
| 1er. SUPLENTE | QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz | |
| 2do. SUPLENTE | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMT/lac

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 8 de la Unidad de Investigaciones Multidisciplinarias (UIM), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en el Instituto de Fisiología Celular ambas dependencias de la UNAM, bajo la tutela del Dr. José Francisco Montiel Sosa con la co-asesoría de la Dra. Sandra Díaz Barriga-Arceo.

AGRADECIMIENTOS

*PAPIIT IN211413: “Fondo Genético
Mitocondrial, Actividad
Proteosomal y Expresión Génica en
el Cáncer de Próstata en Pacientes
Mexicanos”*

AGRADECIMIENTOS

MI ALMA MATER

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE INVESTIGACIONES MULTIDISCIPLINARIAS.
Por acogerme en sus aulas y laboratorios donde me
inspiraron a realizar mis sueños.**

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

DEDICATORIAS

*****A Dios por... "y conocerán la verdad, y la verdad los libertará" Juan 8.30*****

MI FAMILIA

Mis Padres.

Teresa García Rodríguez y Benjamín Campos Huichán, son lo máximo para mí, lo único que puedo decir es que sin su **valor, sacrificio** y **AMOR** no hubiese llegado a donde estoy ahora: MIL GRACIAS POR SU APOYO.

"Un buen padre vale por cien maestros"

Mis Hermanas.

Verónica Claudia Campos -Stover y Gabriela Azucena Campos García, a pesar de todo "Las hermanas siguen siendo hermanas en las buenas y en las malas". Gracias por sus consejos, regaños y sobre todo su amor, porque llegué en un momento inesperado en sus vidas pero aun así tenemos buenos ratos. Igual menciono a mis respectivos cuñados Michael L. Stover y Jesús Liceaga, gracias por tenernos paciencia a las mujeres Campos.

Mi Solecito

Josune Haizeder Liceaga Campos, todavía recuerdo el día que llegaste al mundo, yo estaba en el primer semestre de la licenciatura mi emoción rebasaba los límites, a lo largo de mi estancia universitaria te he visto crecer y has sido mi motorcito de vida. **GRACIAS POR ENSEÑARME A VER COSAS QUE YA HABÍA OLVIDADO Y SOBRE TODO A NUNCA DEJAR DE SER NIÑA.**

Una casa será fuerte e indestructible cuando esté sostenida por estas cuatro columnas: padre valiente, madre prudente, hijo obediente, hermano complaciente.

MIS MENTORES

Dr. José Francisco Montiel Sosa, Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, Dra. Patricia Ramírez Noguera, Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez y Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón: Por **inculcarme** la **pasión** por la Genética Molecular y la Citogenética Toxicológica Humana, gracias por su apoyo, comprensión y consejos. “Uno recuerda con aprecio a sus maestros brillantes, pero con gratitud a aquellos que tocaron nuestros sentimientos” K.G.Jung.

MIS MAESTROS

Dra. Alma Luisa Revilla por inspirarme confianza en aprender Química Analítica.

M. en C. *Maritere Domínguez Rojas*, por contagiarme la actualización constante en Bioinformática, Genética Molecular y Citogenética Toxicológica.

M.V.Z Pablo Martínez Labat, por esa frase inmortal “Canija” y las buenas clases de Parasitología junto con su gran equipo: Q.F.B. Raquel Ma. Del Refugio Tapia Romero y él Q.F.B. José Luis de la Rosa Arana.

Dr. Andrés Romero Rojas, Q.F.B Ma. De Lourdes Galván Ruíz y Q.F.B. René Demián Santos, por enseñarme a tratar una muestra biológica con respeto y velar por la salud del paciente.

Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho, Q.F.B Mario Arturo Morales Delgado y a la Sra. Paty por enseñarme el folklore de la ciencia en mi muy querida asignatura Fitoquímica y Farmacognosia, a usted Sra. Paty muchas gracias por animarme siempre la quiero mucho siempre la voy a recordar.

Dra. Patricia Ramírez Noguera y su esposo el Dr. Roberto Díaz Torres por sus consejos e inspiración en mi carrera de investigación.

MIS AMIGOS

Dra. Jazmín Flores Monroy, QFB. Llasbeth Hernández Calderón, c. Dra. Lucero Panigua, c. M en C. Sofía Piña Olmos, c. M. en C Ángel Rivero, F. Miguel Trejo, e. Tecnología Raúl Ríos, Jehoseba y Josué (Charlie y Lola) Vázquez por celebrar la vida a la manera que sólo sabemos hacerla. Los quiero mucho.



Semper eadem Veritas temporis filia

C O N T E N I D O

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | iv |
| R E S U M E N..... | v |
| ABREVIATURAS..... | vi |
| CAPÍTULO I LA MITOCONDRIA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA: LA ENCRUCIJADA ENTRE LA VIDA Y LA MUERTE..... | 1 |
| 1.1 Aspectos Clave de la Biología Mitocondrial. | 1 |
| | 4 |
| 1.2 Organización, Replicación y Transcripción. | 5 |
| 1.3 Regulación de la expresión genética del mtDNA..... | 9 |
| 1.4 Heteroplasmia y efecto umbral..... | 10 |
| 1.5 Segregación mitótica..... | 11 |
| 1.6 Modo de herencia..... | 11 |
| 1.7 Haplogrupos Mitocondriales y Cáncer de Próstata..... | 13 |
| CAPÍTULO II CÁNCER DE PRÓSTATA | 20 |
| 2.1 Panorama Nacional..... | 20 |
| 2.2.1. Información sobre la próstata..... | 21 |
| 2.2.2. Hiperplasia prostática benigna..... | 22 |
| 2.2.3 Cáncer de próstata..... | 22 |
| 2.2.4. Posibles afecciones precancerosas de la próstata: Neoplasia Prostática Intraepitelial y Atrofia Inflamatoria Proliferativa..... | 23 |
| 2.3 Factores de Riesgo del Cáncer de Próstata..... | 24 |
| 2.3.1. Genética..... | 25 |
| 2.3.2. Familia..... | 25 |
| 2.3.3. Raza..... | 25 |
| 2.4 Signos y Síntomas..... | 28 |
| 2.5 Fisiopatología..... | 28 |
| 2.6 Alteraciones Mitocondriales en el Cáncer de Próstata | 30 |
| CAPÍTULO III DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL | 35 |
| 3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA) y Antígeno Prostático Específico Fracción Libre (PSA-L)..... | 35 |
| 3.2 Fosfatasa Ácida Prostática (AcP)..... | 38 |
| 3.3 Examen digital del Recto (DRE)..... | 38 |
| 3.4 Imagenología transrectal..... | 39 |
| 3.4.1 Ecografía transrectal..... | 39 |
| 3.4.2 Gammagrafía ósea..... | 41 |
| 3.4.3 Tomografía computarizada..... | 41 |
| 3.4.4 Resonancia magnética..... | 42 |
| 3.4.5 Gammagrafía ProstaScint..... | 42 |
| 3.5 Biopsia de próstata..... | 43 |
| 3.5.1 Biopsia basal..... | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.6 Escala Gleason..... | 43 |
| CAPÍTULO IV TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS PROSTÁTICAS..... | 46 |
| 4.1 Protocolo de Vigilancia Activa..... | 46 |
| 4.2 Terapia Hormonal..... | 46 |
| 4.3 Cirugía..... | 47 |
| 4.4 Radioterapia..... | 47 |
| 4.5 Vacunas..... | 48 |
| OBJETIVOS..... | 49 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 49 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 49 |
| CASOS CLÍNICOS..... | 50 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 51 |
| 5.1 <i>Fundamentos Básicos</i> | 51 |
| 5.1.1 Métodos para localizar polimorfismos o mutaciones..... | 51 |
| 5.1.2 Extracción de DNA genómico..... | 51 |
| 5.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 52 |
| 5.1.3 Secuenciación..... | 54 |
| 5.2 Ejecución Experimental..... | 55 |
| 5.2.1 Extracción de DNA genómico a partir de Tejido Prostático..... | 55 |
| 5.2.2 Cuantificación y pureza del DNA..... | 57 |
| 5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Amplificación del genoma mitocondrial completo (mtDNA)..... | 58 |
| 5.2.4 Electroforesis en geles de agarosa..... | 59 |
| 5.2.2 Purificación de los Fragmentos de PCR..... | 61 |
| RESULTADOS..... | 62 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 68 |
| CONCLUSIONES..... | 75 |
| ANEXOS..... | 76 |
| REFERENCIAS..... | 83 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. 1. FISIOLÓGÍA MITOCONDRIAL. MODIFICADO DE COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS (WALLACE, 2012)..... | 2 |
| FIGURA 1. 2. MAPA DEL GENOMA MITOCONDRIAL. (TAYLOR ET AL., 2005)..... | 4 |
| FIGURA 1. 3. CUELLO DE BOTELLA GENÉTICO. LAS MITOCONDRIAS QUE CONTIENEN MTDNA MUTADO SE MUESTRAN EN ROJO MIENTRAS QUE LAS DE MTDNA NORMAL EN VERDE. (TAYLOR ET AL., 2005)..... | 12 |
| FIGURA 1. 4. MIGRACIONES HUMANAS DEL MTDNA. MODIFICADO DE MITOMAP.ORG (HTTP://WWW.MITOMAP.ORG/MITOMAP)..... | 17 |
| FIGURA 1. 5. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES EN EL CONTINENTE AMERICANO. MODIFICADO DE MITOMAP.ORG (HTTP://WWW.MITOMAP.ORG/MITOMAP)..... | 19 |
| FIGURA 2. 1. DISTRIBUCIÓN DE EGRESOS HOSPITALARIOS POR TIPO DE TUMOR MALIGNO POR CADA SEXO. (TOMADO DEL PROGRAMA DE ACCIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, SECRETARÍA DE SALUD, 2009)..... | 20 |
| FIGURA 2. 2. PORCENTAJE DE MORBILIDAD HOSPITALARIA DE LA POBLACIÓN DE 20 AÑOS Y MÁS, POR PRINCIPALES TUMORES MALIGNOS SEGÚN EL SEXO. (TOMADO DE SSA, 2011. BASE DE EGRESOS HOSPITALARIOS 2010)..... | 21 |
| FIGURA 2. 3. GLÁNDULA PROSTÁTICA. (TOMADO DEL PROGRAMA DE ACCIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, SSA, 2009)..... | 29 |
| FIGURA 2. 4. BIOENERGÉTICA Y MUTACIONES MITOCONDRIALES. MODIFICADO DE COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS. (WALLACE, 20012)..... | 33 |
| FIGURA 2. 5. COMPLEJO I Y SUBUNIDAD NADH MITOCONDRIALES. (WALLACE, 2012)..... | 34 |
| FIGURA 3. 1. DIAGRAMA DE FLUJO DE PROBABILIDAD DE CÁNCER DE PRÓSTATA POR LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO ESPECÍFICO PROSTÁTICO (PSA) TOTAL Y LIBRE. (SS-DF, 2001)..... | 37 |
| FIGURA 3. 2. PUNTAJE GLEASON. (MODODIFICADO DE HEINDENREICH, 2010)..... | 44 |
| FIGURA 3. 3. GRADOS HISTOLÓGICOS GLEASON. (MODODIFICADO DE HEINDENREICH, 2010)..... | 45 |
| FIGURA 4. 1. TRATAMIENTO SEGÚN LAS ETAPAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. (ACS, 2012)..... | 48 |
| FIGURA 5. 1. DIAGRAMA TIEMPO-TEMPERATURA EN UN PROGRAMA DE PCR..... | 53 |
| FIGURA R. 1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 0.7 %. SE MUESTRAN LOS AMPLIFICADOS DE 650-700 BP DEL MTDNA DE LOS FRAGMENTOS (F) F1- F18, DE LAS MUESTRAS C+; C-..... | 62 |
| FIGURA R. 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 0.7 %. SE MUESTRAN LOS AMPLIFICADOS DE 650-700 BP DEL MTDNA DE LOS FRAGMENTOS (F) F19- F24, DE LAS MUESTRAS C+; C-..... | 62 |
| FIGURA R. 3. MUTACIONES LOCALIZADAS EXPERIMENTALMENTE ASOCIADAS AL CÁNCER DE PRÓSTATA EN LA MUESTRA C+;C-..... | 64 |
| FIGURA R. 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GENOMA MITOCONDRIAL HUMANO..... | 65 |
| FIGURA R. 5. RED FILOGENÉTICA EXPERIMENTAL DE LA MUESTRA C+; C-..... | 66 |
| FIGURA R. 6. ELECTROFEROGRAMA DE LA MUTACIÓN C13478G PRESENTE EN LAS MUESTRAS BT, PR, C+;C- CON POSIBLE ASOCIACIÓN AL CÁNCER DE PRÓSTATA..... | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. 1. CÓDIGO GENÉTICO MITOCONDRIAL DE MAMÍFEROS. (WATSON ET AL., 2006). | 6 |
| TABLA 1. 2. DIFERENCIAS ENTRE EL CÓDIGO GENÉTICO UNIVERSAL Y EL MITOCONDRIAL (WALLACE, 2012). | 7 |
| TABLA 1. 3. HAPLOGRUPOS NATIVO-AMERICANOS. (RICHARDS ET AL., 1998). .. | 18 |
| TABLA 2. 2. MUTACIONES MITOCONDRIALES ASOCIADAS AL CÁNCER DE PRÓSTATA. (JERÓNIMO ET AL, 2001). | 30 |
| TABLA 5 .2. PREPARACIÓN DE UNA PCR PARA UN VOLUMEN DE REACCIÓN DE 100 μ L. | 58 |
| TABLA R. 1. MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EXPERIMENTALES C+; C-..... | 63 |
| TABLA R. 2. MUTACIÓN NO DESCRITA CON CAMBIO DE AMINOÁCIDO Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN AL CÁNCER DE PRÓSTATA SEGÚN MITLMPACT CSS BIOINFORMATICS LAB. | 67 |
| TABLA R. 3. MUTACIÓN C13478G PRESENTE EN LAS MUESTRAS BT, PR, C+;C- CON POSIBLE ASOCIACIÓN AL CÁNCER DE PRÓSTATA SEGÚN MITLMPACT CSS BIOINFORMATICS LAB. | 67 |

R E S U M E N

En México, el cáncer de próstata se ha convertido en un problema de salud pública, ya que al año se observa una tasa de mortalidad de 121.57 por cada 100 mil hombres lo que representa el 8.1% de defunciones, en la población de hombres de 60 años (INEGI, 2008). Diversas investigaciones se han dedicado a identificar marcadores que pronostiquen la fase primaria y agresiva del cáncer de próstata (Shen et al., 2000). Este es el caso de las mutaciones encontradas en el genoma mitocondrial en las últimas décadas (Khandrika, et al, 2009). En el año 2005 se describió que el 11-12% de los pacientes de cáncer de próstata presentaron mutaciones en la subunidad citocromo oxidasa (COX I) que alteran los aminoácidos conservados (Petros et al., 2005). Recientemente se ha estudiado la frecuencia de haplogrupos mitocondriales en poblaciones europeas y asiáticas. (Alvarez-Cubero et al., 2012; Kim et al., 2008; Mueller et al., 2009), pero se carece de estudios similares en la población mexicana. Con el desarrollo de las técnicas masivas de la biología molecular, ha sido posible la identificación de marcadores moleculares. Es por ello, que su aplicación en el estudio del cáncer de próstata puede resultar de importancia. En la actualidad se cuenta con la secuencia genómica completa de la especie humana lo que permite estudiar la expresión de todos los genes en un solo experimento. De igual forma se cuenta con una infinidad de bases de datos que permiten el análisis simultáneo de los genes identificados (Sorlie et al. 2001; Van de Vijver et al. 2002). En las instalaciones de investigación de la Unidad de Investigaciones Multidisciplinarias (UIM, UNAM, FESC), bajo la dirección del Dr. José Francisco Montiel Sosa, ya se encontraron las primeras mutaciones candidatas al CaP, en el locus *MT-CO1*, alelo *G6261A* produciendo un cambio de aminoácido de manera non-syn:A-T y en el locus *MT-ND5*, alelo *C12705T* cuyo cambio de aminoácido es syn:I-I relacionada con el haplogrupo R. Otras mutaciones localizadas probables asociadas al CaP: T489C, MT-DLOOP, C13478G, MT-ND5 y G12009A, MT-ND4 (Aún no descrita). También se encontraron las mutaciones en el locus MT-ATP 6, alelo *A9300G* con un cambio de aminoácido non-syn:A-T asociada a la miopatía y en el locus MT-RNR1, alelo *A663G* con cambio de aminoácido 12S rRNA relacionada al riesgo de arterioesclerosis coronaria. Dichas variaciones son las primera reportadas en México. Esta investigación es apenas un preámbulo para entender el cáncer de próstata, su inicio, progreso y desarrollo de metástasis en pacientes mexicanos. Cabe destacar que aún queda pendiente encontrar la delección 3.4 kb mitocondrial en pacientes mexicanos. De igual manera, se realizó el análisis filogenético afiliado a los haplogrupos mitocondriales.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------|--|
| ATP | Trifosfato de adenosina. |
| BT | Biopsia Transrectal |
| BrEt | Bromuro de etidio. |
| C+ | Tejido Neoplásico |
| C- | Tejido Benigno |
| Ca | Cambio de aminoácido |
| CaP | Cáncer de Próstata |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico. |
| dNTPs | Desoxirribonucleosidos trifosfatos. |
| EyMH | Enfermedad asociada y Marcador de haplogrupo; |
| GBF | GB Frecuencia |
| L | Locus |
| M | Muestra |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero. |
| mtDNA | Ácido desoxirribonucleico mitocondrial. |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido. |
| Nc | Nucleótido Cambiado |
| Ncod | Número de codón |
| NS | Nucleótido Sustituido |
| nDNA | Ácido desoxirribonucleico nuclear. |
| Non-syn | Mutación no Sinónima |
| O_H | Origen de replicación de la cadena H. |
| O_L | Origen de replicación de la cadena L. |
| OXPHOS | Fosforilación oxidativa. |
| P | Posición |
| PA | Posición del Aminoácido |
| pb | Pares de bases. |
| Pcod | Posición de codón |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| PP2p | Predicción PolyPhen2 |
| PR | Prostatectomía Radical |
| rRNA | Ácido ribonucleico ribosomal. |
| tRNA | Ácido ribonucleico de transferencia. |
| tRNA^{Leu} | RNA de transferencia para leucina. |
| tRNA^{Phe} | RNA de transferencia para fenilalanina. |
| tRNA^{Ser} | RNA de transferencia para serina. |
| tRNA^{Val} | RNA de transferencia para valina. |
| SA | Sustitución del Aminoácido |
| syn | Mutación Sinónima |

CAPÍTULO I LA MITOCONDRIA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA: LA ENCRUCIJADA ENTRE LA VIDA Y LA MUERTE

1.1 Aspectos Clave de la Biología Mitocondrial.

Se cree que la mitocondria (organelo que aporta el 90% de la energía que necesitan las células) surgió al acumularse el oxígeno en la atmósfera terrestre. Posiblemente la mitocondria y el núcleo de la célula eucariota se crearon a la vez, al incorporarse por endocitosis células procariotas aeróbicas al interior de la célula eucariótica anaeróbica y fusionarse ambas. Con el tiempo, la mayoría de los genes procarióticos (genes protomitocondriales) se integraron en el genoma nuclear, con lo que el eucariota primitivo anaeróbico ya podía vivir en una atmósfera aeróbica, rica en oxígeno; sólo una pequeña fracción del genoma procariótico primigenio permaneció en la mitocondria (*Wallace, 2005*).

Resultados recientes en genética molecular han confirmado el origen bacteriano de las mitocondrias eucariotas, como remanentes de protobacterias que colonizaron células anaeróbicas nucleadas hace millones de años, donde la relación entre los dos organismos se volvió simbiótica, el huésped eucariota proporcionaba alimento y protección, y la bacteria detoxificaba la célula del dañino oxígeno (*Andreu et al., 2004*). Los estudios indican que las mitocondrias se originaron a partir de un ancestro de las bacterias del género *Rickettsia* (*Gray MW, 1993*).

De manera general, la función de la mitocondria se resume en la Figura 1.1 donde se muestra que: los equivalentes reducidos en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación pasan a través de complejos proteínicos incrustados en la membrana mitocondrial interna (cadena transportadora de electrones) que consiste de 4 complejos multiméricos (I al IV) más 2 pequeños acarreadores de electrones, coenzima Q (ubiquinona) y citocromo C. La energía generada por las reacciones de la cadena transportadora de electrones es usada para bombear protones de la matriz mitocondrial dentro del espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa. Esto crea un gradiente electroquímico de protones el cual es utilizado por el complejo V (o ATP sintasa), una fina máquina que funciona como una turbina rotatoria que genera ATP como consecuencia del flujo de protones

Las células poseen un número muy variable de mitocondrias, dependiendo del tejido. Cada mitocondria posee varias copias de un único cromosoma, situadas en la matriz mitocondrial y ancladas a la membrana interna. En consecuencia, el número de copias de mtDNA en una célula oscila entre 200 y 100,000. El cromosoma mitocondrial es bicatenario y circular, como el de procariotas, aunque de tamaño muy inferior: 16569 pb en humanos, con una longitud de 5 μm y una masa molecular de 10 MDa; esto es unas 3000 veces menos que la longitud del cromosoma nuclear más pequeño. El DNA mitocondrial total, dependiendo del tejido, se calcula entre un 0,05 y un 20% del DNA total de la célula (*Luque et al., 2011*); una de las hebras posee un mayor contenido en bases purínicas, por lo que se conoce como hebra pesada o H (heavy), mientras que la otra es la hebra ligera o L (light) abundante en citosina (*Strachan et al., 2004*).

El ácido desoxirribonucleico mitocondrial humano contiene información para 37 genes (Figura 1.2): 2 que codifican para ácidos ribonucleicos ribosómicos (rRNA), 22 para tRNA y 13 para polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), etapa terminal de la ruta de producción de ATP. Estos péptidos corresponden a siete subunidades (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH): ubiquinona óxido-reductasa (complejo I); una subunidad (cyt b) de la ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa (complejo III); tres subunidades (CO I, II, III) de la citocromo c oxidasa (complejo IV), y dos subunidades de la ATP sintetasa (complejo V). El resto de los polipéptidos componentes de estos complejos, así como el complejo II completo, están codificados en el DNA nuclear. La biogénesis de este sistema constituye un caso único en la célula ya que para su formación se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos (*Solano et al., 2011*).

1.2 Organización, Replicación y Transcripción.

El genoma mitocondrial humano es muy compacto. Alrededor de 93% de las secuencias de DNA son secuencias codificantes. Los 37 genes mitocondriales carecen de intrones y están empacados de forma estrecha (en promedio uno por 0.45 kb). Las secuencias codificantes de algunos genes como los que codifican las subunidades seis y ocho de la ATPasa mitocondrial muestran cierta superposición y en casi todas las demás secuencias codificantes de genes están contiguas o separadas por una o dos bases no codificantes. Algunos genes carecen incluso de codones de terminación y para superar esta deficiencia tienen que introducirse codones UAA a nivel postranscripcional (poliadenilación de los mRNAs). La única región que carece de DNA codificante corresponde al 7% de la molécula, es la región de desplazamiento del asa (D) en la que se genera una estructura de DNA de cadena triple debido a la síntesis duplicada de una pieza corta de DNA de cadena H (DNA 7S) (Fogg, 2011). Aún sin ser una región codificante, en ella se encuentran los promotores de transcripción y los elementos reguladores de la expresión del DNA, por lo que a ésta zona se le conoce como región control. Otra característica distintiva de la organización genética mitocondrial es que los genes de los tRNAs se sitúan separando los genes de los rRNA y los genes codificantes de proteínas (disposición importante para el procesamiento del RNA) (López, 2007).

El código genético mitocondrial (Tabla 1.1) se usa para decodificar los transcritos de las cadenas pesada y ligera a fin de proporcionar un total de sólo 13 polipéptidos. Hay 60 codones mitocondriales de sentido, uno menos que en el código universal, y cuatro codones de terminación, dos de los cuales, UAA y UAG, sirven así mismo como codones de terminación en el universal, pero los otros dos son AGA y AGG y especifican arginina en éste último. UGA codifica triptófano en lugar de servir como codón de paro y AUA especifica metionina no isoleucina. Las diferencias entre el código genético universal y el mitocondrial se especifican en la Tabla 1.2.

Tabla 1. 1. Código genético mitocondrial de mamíferos. (Watson et al., 2006).

| | | Segunda posición | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|------------------|--------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|------|-------|---|
| | | U | | C | | A | | G | | | | |
| Primera posición (extremo 5') | U | UUU | Phe | UCC | Ser | UAU | Tyr | UGU | Cys | U | | |
| | | UUC | (GAA)† | | | UAC | (GUA) | UGC | (GCA) | C | | |
| | | UUA | Leu | | | UCA | (UGA) | UAA | stop | UGA | Trp | A |
| | | UUG | (UAG) | | | UCG | | UAG | stop | UGG | (UCA) | G |
| | C | CUU | Leu | CCU | Pro | CAU | His | CGU | Arg | U | | |
| | | CUC | | CCC | | (GUG) | CGC | (UCG) | | C | | |
| | | CUA | | CCA | | (UGG) | CGA | | | A | | |
| | | CUG | | CCG | | CAG | (UUG) | CGG | | G | | |
| | A | AUU | Ile | ACU | Thr | AAU | Asn | AGU | Ser | U | | |
| | | AUC | (GAU) | ACC | | (GUU) | AGC | (GCU) | C | | | |
| | | AUA | Met | ACA | | (UGU) | AAA | Lys | AGA | stop | A | |
| | | AUG | (CAU)‡ | ACG | | AAG | (UUU) | AGG | stop | G | | |
| | G | GUU | Val | GCU | Ala | GAU | Asp | GGU | Gly | U | | |
| | | GUC | | GCC | | (GUC) | GGC | (UCC) | | C | | |
| | | GUA | | (UAC) | | GCA | (UGC) | GAA | | Glu | GGA | A |
| | | GUG | | GCG | | GAG | (UUC) | GGG | | G | | |

*Las diferencias entre el código genético mitocondrial y el universal están en verde.

† Cada grupo de codones está sombreado en gris y lo lee un tRNA individual cuyo anticodón, escrito 5'→3', aparece entre paréntesis. Un tRNA que contiene un U en la primera posición (5') del anticodón lee cada grupo de cuatro codones. tRNA con G o U, en la primera posición del anticodón leen con bombardeo de GU los grupos de dos codones en los que éstos terminan en U/C o A/G respectivamente. Los anticodones con frecuencia contienen bases modificadas.

‡ Obsérvese que en la C en la primera posición anticodónica participa en apareamientos inusuales.

El genoma mitocondrial codifica todas las moléculas de rRNA y tRNA que necesita para sintetizar proteínas, pero se basa en los genes codificantes nucleares para

proporcionar todos los otros componentes. Puesto que sólo existen 22 tipos diferentes de tRNA mitocondrial humano, las moléculas de tRNA individuales deben estar disponibles para interpretar varios codones distintos. Esto se logra mediante la variación de la tercera base en la interpretación del codón. Ocho de las 22 moléculas de tRNA tienen anticodones que son capaces de reconocer familias de cuatro codones que sólo difieren en la tercera base y 14 reconocen pares de codones que son idénticos en las posiciones de las dos primeras bases y comparten una purina o una pirimidina en la tercera base. Por consiguiente, entre ellas, las 22 moléculas de tRNA mitocondrial pueden reconocer un total de 60 codones $[(8 \times 4) + (14 \times 2)]$ (Fogg, 2011).

Tabla 1. 2. Diferencias entre el código genético universal y el mitocondrial (Wallace, 2012).

| Codón | Código Universal | Código mitocondrial humano |
|-------|------------------|----------------------------|
| UGA | Stop | Trp |
| AGA | Arg | Stop |
| AGG | Arg | Stop |
| AUA | Ile | Met |

La replicación del cromosoma mitocondrial humano se realiza por un mecanismo diferente al de procariontes y genoma nuclear de eucariotas. En la actualidad hay varias teorías que explicarían la replicación del mtDNA, las cuales se resumen de la siguiente forma:

- a) **Modelo clásico:** La replicación del mtDNA, unidireccional y asimétrica, se realiza mediante dos orígenes diferentes (O_H y O_L) la molécula de doble cadena de mtDNA se replica de forma asincrónica. La replicación de la cadena L comienza a partir de su origen de replicación (O_L) sólo después de que la síntesis de la cadena H haya completado cerca de dos tercios del círculo y, además, procede en la dirección opuesta. La replicación de la cadena H se inicia usando un pequeño fragmento de transcrito de la cadena L que sintetiza la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), la cual, tiene acceso al molde de DNA mediante la unión de los factores de transcripción

A, B1 y B2 (TFAM, TFB1 y TFB2M) a la doble cadena de DNA. El precursor del RNA se corta mediante la endonucleasa procesadora de RNA mitocondrial (MRPRNasa) en el origen de replicación de la cadena H (O_H). Los desoxirribonucleótidos se añaden al extremo terminal 3' libre del transcrito mediante la DNA polimerasa gamma (POLG). La proteína "Twinkle", las topoisomerasas 1 y 3 (TOP1 y TOP3) y las proteínas de unión a monocadena (mtSSB) participan en la preparación de las cadenas molde de la cadena simple para que la POLG realice su función correctamente. (López, 2007; Clayton, 1982; Kasamatsu y Vinograd, 1974).

- b) **Modelo nuevo:** Recientemente, se ha puesto en duda el modelo de replicación de desplazamiento de la hebra y ahora, basándose en una técnica que utiliza métodos bidireccionales, se ha propuesto que el mtDNA se replica de forma unidireccional desde el origen O_H . El punto O_H señala el principio y el fin de la replicación (López, 2007; Holt et al., 2000). También se ha propuesto que podría replicarse de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el DNA bacteriano (López, 2007; Bowmakerb et al., 2013). Este nuevo modelo, que está tomando bastante fuerza, no explica la mayoría de datos que hasta ahora se habían obtenido y que eran explicados por el modelo anterior.
- c) **Modelo clásico renovado:** Hace poco tiempo se renovó el modelo clásico (López, 2007; Brown y Clayton, 2006), de forma que en determinados momentos y dependiendo del tejido existiendo deferentes inicios de replicación. Además se produjeron diferentes pausas en la replicación también dependiendo del tejido.

La replicación del mtDNA no tiene lugar específicamente en la fase S, sino a lo largo de todo el ciclo celular y no todas las moléculas de DNA se replican una vez por ciclo, sino que lo hacen al azar.

La transcripción se lleva a cabo por una sola RNAPol que está formada por un solo polipéptido y que, para la iniciación, requiere la presencia de un factor de transcripción mtTFA. El mtDNA se transcribe a partir de 3 lugares de iniciación,

dos para la hebra pesada (H1 y H2) y una para la ligera (L), produciéndose así tres transcritos primarios diferentes (dos de ellos complementarios y correspondientes a toda la longitud del cromosoma, 16,5 kb). Los tres promotores se encuentran situados en la región no codificante de control o D-loop. Aún se desconoce si el inicio en H1 y H2 depende de un mismo promotor o de dos independientes.

A partir del primer lugar de iniciación de la hebra pesada H1 se transcribe el DNA que codifica los tRNA^{Phe}, rRNA 12S, tRNA^{Val} y rRNA 16S; la transcripción se detiene tras este último, mediante la participación de un factor de terminación (mTERF). Cuando la transcripción comienza en el segundo punto de inicio H2, localizado inmediatamente tras el tRNA^{Phe}, el transcrito primario (L2) continúa más allá del punto de terminación anterior, completando el resto del cromosoma. Por tanto, el lugar de iniciación define qué tipo de RNAs (ribosómicos o mensajeros) deben sintetizarse. La selección del punto de inicio está a su vez regulada por las hormonas tiroideas. Gracias a esta doble unidad de transcripción la mitocondria sintetiza mucha mayor cantidad de RNAs ribosómicos que el resto de productos génicos. A partir del promotor de la hebra ligera se sintetiza una sola molécula (que es una hebra pesada, H) que sólo codifica 8 tRNAs y un mRNA. Los 3 transcritos primarios sufren una maduración para dar lugar cada uno a varios rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros; del transcrito H se origina también el RNA cebador para la replicación de la hebra H (*Luque et al., 2011*).

1.3 Regulación de la expresión genética del mtDNA.

La biogénesis de la mitocondria depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear. Entre las proteínas nucleares que pueden actuar regulando esta interacción se encuentran el factor de iniciación de la transcripción TFAM que podría ser el responsable tanto de los niveles de mtRNA como del número de copias de mtDNA (*López, 2007; Ficher y Clayton, 1988*). La regulación de la relación entre rRNAs y mRNAs mitocondriales se realiza mediante la selección del lugar de iniciación de la transcripción de la cadena pesada (*Montoya et al., 1983*), que a su vez parece que está relacionado con el factor de terminación mTERF codificado en el núcleo, y a nivel del procesamiento de los RNAs policistrónicos.

Asimismo, la regulación transcripcional puede realizarse como respuesta a hormonas, en particular a hormonas tiroideas que pueden actuar bien directamente sobre el mtDNA o de un modo indirecto a través de la activación de genes nucleares (López, 2007), estabilizando los RNAs maduros (López, 2007; Enriquez et al., 2010) y a nivel de la traducción de los mRNAs (López, 2007; Ostronoff et al., 2010). Recientemente, se ha visto que la fosforilación de mTERF puede regular la terminación de la transcripción al final de la región de los rRNAs e incluso participa regulando la iniciación en H1 (López, 2007; Prieto-Martin et al., 2012).

1.4 Heteroplasmia y efecto umbral.

Cada célula contiene cientos o miles de copias del mtDNA dependiendo del tejido o del tipo de célula, su dependencia del metabolismo oxidativo, o su estado metabólico. Durante la división celular, las moléculas de mtDNA se distribuyen de forma aleatoria entre las nuevas células. En tejidos sanos, todas las copias del mtDNA son idénticas (homoplasmia). Las mutaciones patogénicas del mtDNA normalmente afectan a alguna pero no a todas las copias del mtDNA de una célula, un tejido, o un individuo, lo cual resulta en una mezcla de genomas mitocondriales mutados y no mutados (heteroplasmia), y el fenotipo clínico de una mutación puntual particular en el mtDNA está determinado por la proporción relativa de genomas sanos y mutados en los diferentes tejidos. Dependiendo de la demanda energética de una célula, el nivel de genomas mutados requeridos para producir una expresión fenotípica de la mutación varía (efecto umbral). Este efecto es diferente en tejidos distintos, pero, cuando el umbral es sobrepasado, la producción de ATP es menor a la demanda de energía (Andreu et al., 2004) llegando a estar por debajo de la mínima necesaria para el funcionamiento de los tejidos y, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el mtDNA, se provoca la aparición de la enfermedad. Si el número de moléculas de mtDNA dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de DNA normal y no se manifestará el defecto genético. El número de moléculas de DNA es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los tejidos que preferentemente se afectan son la

visión, el sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos, riñón e hígado (Solano et al., 2011).

1.5 Segregación mitótica.

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas por lo que si en una célula coexisten dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia), a lo largo de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el DNA mitocondrial normal, homoplásmico para el DNA mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA mutado que contenga (Solano et al., 2011). Este fenómeno llamado segregación mitótica explica como ciertos pacientes con desórdenes relacionados al mtDNA de hecho pueden cambiar de un fenotipo clínico a otro diferente a medida que envejecen (DiMauro et al., 2005).

1.6 Modo de herencia.

La herencia mitocondrial es una de las excepciones a los principios de transmisión mendeliana de las enfermedades monogénicas. Todos los individuos heredan el DNA mitocondrial (mtDNA) de su madre, por tanto, una mutación patológica en el genoma mitocondrial de una mujer se puede transmitir a toda su descendencia, mientras que el varón en raras ocasiones transmite una mutación análoga (Luque et al., 2011).

El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del DNA nuclear. Este fenómeno puede estar originado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales libres de oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un DNA que no está protegido por proteínas (Solano et al., 2011). Las mutaciones del mtDNA son corregidas por mecanismos complejos de escisión y transferencia (los sitios dañados son escindidos, removidos, transferidos y sustituidos por las formas correctas), sin embargo, estos mecanismos son bastante ineficientes (10 a 17 veces

menos efectivos comparados a los que reparan mutaciones de DNA nuclear) (Ruíz et al., 2012).

En la mujer, durante la producción de oocitos primarios, un selecto número de moléculas de mtDNA se transfieren a cada oocito. La maduración del oocito esta asociada con la replicación rápida de las moléculas de mtDNA. Este evento de restricción-amplificación puede provocar un cambio aleatorio de la carga de mtDNA mutado entre las generaciones y es responsable de los niveles variables de éste, observado en la descendencia afectada de madres con la mutación patogénica mitocondrial. A este evento se le conoce como “cuello de botella genético” (Fig. 1.3), (Taylor et al., 2005).

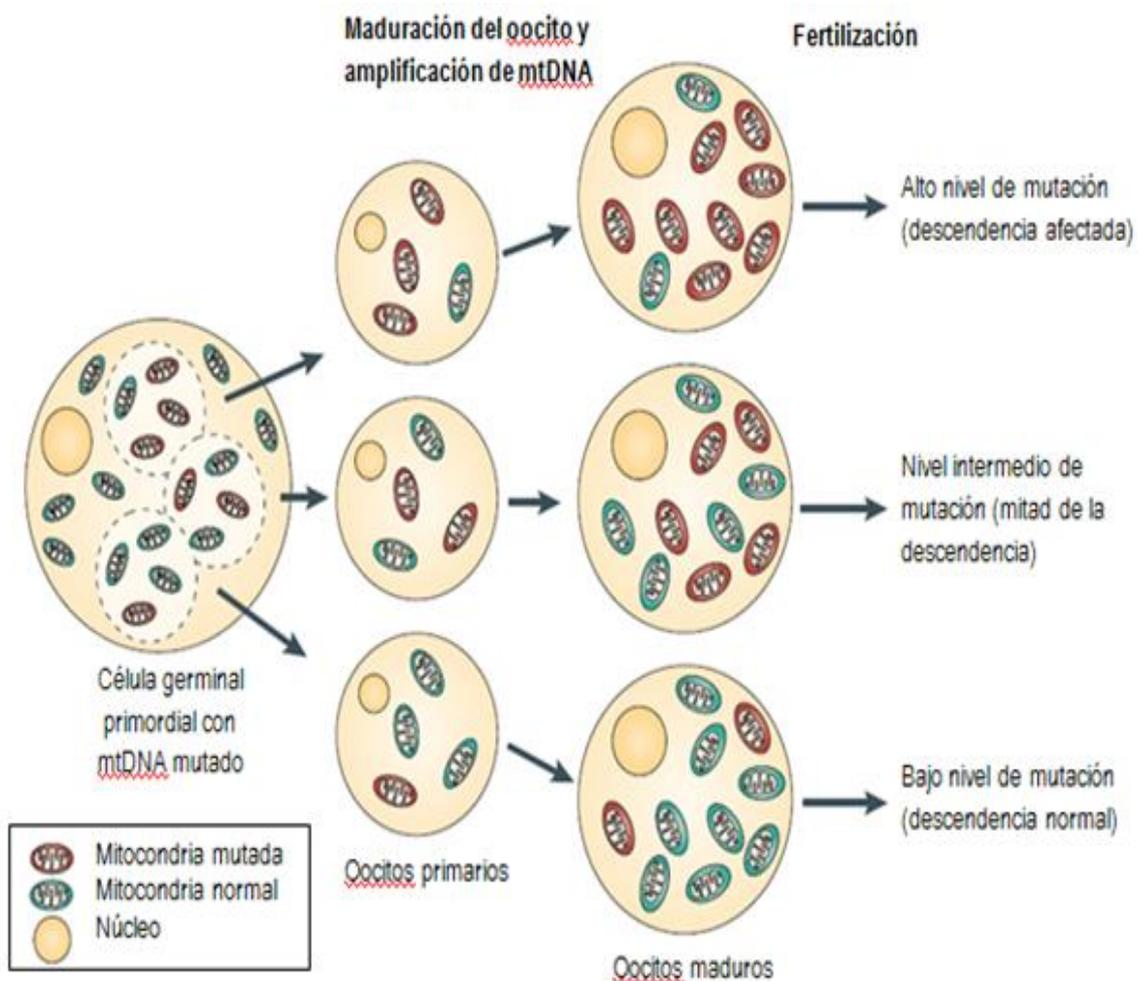


Figura 1.3 . Cuello de Botella Genético. Las mitocondrias que contienen mtdna mutado se muestran en rojo mientras que las de mtDNA normal en verde. (Taylor et al., 2005).

A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA no aparenta sufrir una recombinación de sus bases nucleotídicas durante la división y reproducción de la mitocondria. La ausencia de recombinación permite que las mutaciones se acumulen en una mayor o menor línea o de manera cronológica en los linajes maternos. Como resultado, hay una ambigüedad mínima en la reconstrucción de la bifurcación de los linajes femeninos a lo largo de los cambios acumulados en sus mtDNAs (*Schurr, 2010*). De tal forma que, en sus migraciones fuera de África, los humanos han estado acumulando variaciones distintivas del mtDNA de nuestro ancestro “Eva mitocondrial”, resultando en numerosos haplotipos característicos de los diferentes grupos étnicos (*DiMauro, 2005*), en la Figura 1.4 se observa el mapa de migraciones del mtDNA.

1.7 Haplogrupos Mitocondriales y Cáncer de Próstata.

Se han empleado dos métodos moleculares diferentes para aprovechar las características genéticas del mtDNA. El análisis de los polimorfismos en los fragmentos largos de restricción (RFLP) contempla mtDNAs individuales por variación de secuencia usando una serie de enzimas (endonucleasas de restricción) que cortan la molécula de mtDNA en un nucleótido específico de la secuencia conocido como sitio de reconocimiento. Si hay diferencias entre dos individuos las enzimas de restricción cortan su DNA en puntos diferentes en el mtDNA, los fragmentos resultantes serán de diferentes longitudes. En el análisis de RFLP, la combinación única de los fragmentos detectados por una serie de enzimas de restricción representa polimorfismos genéticos dentro de un haplotipo de mtDNA. Un grupo de haplotipos relacionados que se define por una serie de RFLPs compartidos es llamado haplogrupo o linaje de mtDNA. Una variación genética considerable dentro y entre las poblaciones humanas se ha detectado mediante el análisis de RFLP. Aunque una porción significativa de esta variación es compartida entre todas las poblaciones, una cierta cantidad se encuentra dentro de poblaciones geográficamente circunscritas o grupos étnicos (*Schurr, 2010*).

Otro método de estudio de la variación del mtDNA involucra la secuenciación directa de uno o ambos segmentos hipervariables (HVS-I y HVS-II *hypervariable*

segments) de la región control. A diferencia del análisis de RFLP, que puede estar ligado a un análisis general del genoma mitocondrial, la secuenciación directa proporciona una lectura nucleótido por nucleótido de una porción del mtDNA. Ya que el rango de mutación es elevado en la región control, la secuenciación directa proporciona una vista detallada en los pequeños cambios genéticos que pueden haber ocurrido recientemente. Las mutaciones en la región control ayudan a definir linajes específicos de mtDNA en las poblaciones humanas (como lo hacen ciertos RFLPs), y también revelan la diferenciación genética de esos linajes en áreas geográficamente circunscritas. Por cálculos estadísticos de la cantidad de variación en las regiones control dentro y entre linajes de mtDNA, es posible estimar la edad relativa de las variantes genéticas en una región geográfica particular (*Schurr, 2010*). Así, la mayoría de los polimorfismos determinantes de haplogrupos son específicos de un continente.

La clasificación de los haplogrupos de mtDNA está basada en la información obtenida mediante análisis RFLP de la región codificante y de las secuencias de nucleótidos de los segmentos hipervariables en la región control. Los haplogrupos se codifican con letra capital y la subclase con un número común (*Torroni et al., 1996; Richards et al., 1998*).

La evolución del mtDNA humano se caracteriza por los distintos linajes étnicos que ya han sido identificados: tres africanos, nueve europeos y siete asiáticos (incluyendo nativo americanos) (*Lehtonen, 2012*). Cerca del 99% de los mtDNAs europeos se incluyen dentro de nueve haplogrupos designados como H, I, J, K, T, U, V, W y X (*Lehtonen, 2012; Torroni et al., 1996*), y estos haplogrupos pueden ser además agrupados dentro de cuatro clados: HV, UK, TJ y WIX (*Lehtonen, 2012; Richards et al., 1998*). En Asia, el 77% de los mtDNAs se encuentran dentro de un superhaplogrupo M que a su vez está subdividido en pequeños subhaplogrupos designados como C, D, G y E. La mayoría de los mtDNAs asiáticos restantes son de los haplogrupos A, B y F. Esencialmente todos los mtDNAs nativo americanos se encuentran dentro de cuatro haplogrupos: A, B, C y D (*Lehtonen, 2012; Torroni y Wallace, 1994*), en la Figura 1.9 se pueden observar la localización geográfica de todos los haplogrupos.

Una comparación de nativo americanos, siberianos y asiáticos reveló que los mismos linajes de mtDNA en todos los grupos comparten mutaciones en la región control que son específicas de los haplogrupos. La explicación más simple es que las mutaciones de la región control surgieron en Asia en los linajes mitocondriales fundadores y fueron traídos hacia el nuevo mundo por el nativo americano ancestral. La mayoría de las variantes en las secuencias de la región control de los nativo americanos parecen ser únicas. La distribución geográfica y lingüística de los haplogrupos A-D en América también sugiere que todos ellos estuvieron presentes en la(s) migración(es) original(es). Los cuatro haplogrupos se han observado en poblaciones fuera de América y se han encontrado también en los tres grupos lingüísticos nativo americanos propuestos (Amerindio, Na-Dene, Eskaleut). Sin embargo, los indios Na-Dene y Eskimo-Aleuts originales parecen carecer del haplogrupo B. Aunque los mtDNAs de haplogrupos A-D se encuentran frecuentemente encontrados juntos en una sola población, varias tribus carecen de haplotipos de al menos uno de estos haplogrupos. Esta tendencia refleja el hecho de que el flujo genético y los eventos fundadores han jugado un papel significativo en la formación de la distribución de los haplotipos mitocondriales en dichas poblaciones. Esta interpretación es también sostenida por la alta frecuencia de haplotipos mitocondriales “privados” en diferentes tribus amerindias. Dichos resultados sugieren la idea de que un aislamiento temprano de las tribus y los efectos que fundaron permitieron la divergencia del juego de genes en diferentes regiones (aunque no todos los científicos están de acuerdo en este punto). También es importante mencionar que la composición genética de una población antigua puede no ser la misma a la población que actualmente ocupa la misma región geográfica, debido a las migraciones, el flujo genético u otros procesos (Schurr, 2010).

Los haplogrupos A, C y D parecen ser los linajes mitocondriales más antiguos en el nuevo mundo (aproximadamente 47,650 a 23,535 años de edad). Las edades de estos haplogrupos en Siberia son generalmente comparables para los de América. La edad considerable de estos haplogrupos sugiere que la relación entre poblaciones Siberianas y Nativo Americanas son bastante antiguas. El haplogrupo B en América es considerablemente más joven (17,700 a 13,500 años de edad) que los haplogrupos A, C y D. Sin embargo, análisis recientes en la región control en

nativo americanos indican que el haplogrupo B puede ser más diverso (y por lo tanto más antiguo) que los haplogrupos A, C y D. Otros trabajos también sugieren que los haplotipos del haplogrupo B estuvieron presentes en el centro-este de Asia al menos 24, 000 a 30,000 años antes (*Schurr, 2010*).

Un número de mtDNAs encontrados en nativo americanos no caen dentro de los haplogrupos A-D. Estos fueron originalmente designados como “otros” haplotipos y la mayoría fueron atribuidos a una mezcla no nativa debido a sus afinidades aparentes hacia los mtDNA europeos. En particular, los otros haplotipos detectados en Ojibwa y Navajo se parecen al haplogrupo X visto en canadienses franceses y otros grupos europeos. Un solo haplotipo en los Mayas también parece pertenecer al haplogrupo europeo H, el linaje mitocondrial más comúnmente observado en poblaciones caucásicas americanas y europeas. Sin embargo, se ha visto que los otros haplotipos similares al haplogrupo X europeo de hecho pertenecen a una divergencia de este linaje en particular. Todos los haplotipos del haplogrupo X amerindios comparten un conjunto de RFLP y mutaciones en la secuencia de la región control con el haplogrupo X europeo, pero por otro lado, difieren de ellos por muchas mutaciones en la región control. También, cuatro sublinajes distintos del haplogrupo X se han identificado en poblaciones amerindias implicando que esto ha sido suficiente a lo largo del nuevo mundo para tener una diversificación genética considerable. En contraste con la distribución de los haplogrupos A a D, el haplogrupo X se encuentra en poblaciones exclusivamente cercanas en Norte América. También se ha detectado en pocas muestras brasileñas antiguas lo que implica que dicho haplogrupo estuvo presente en el nuevo mundo antes que los primeros europeos arribaran (*Schurr, 2010*).

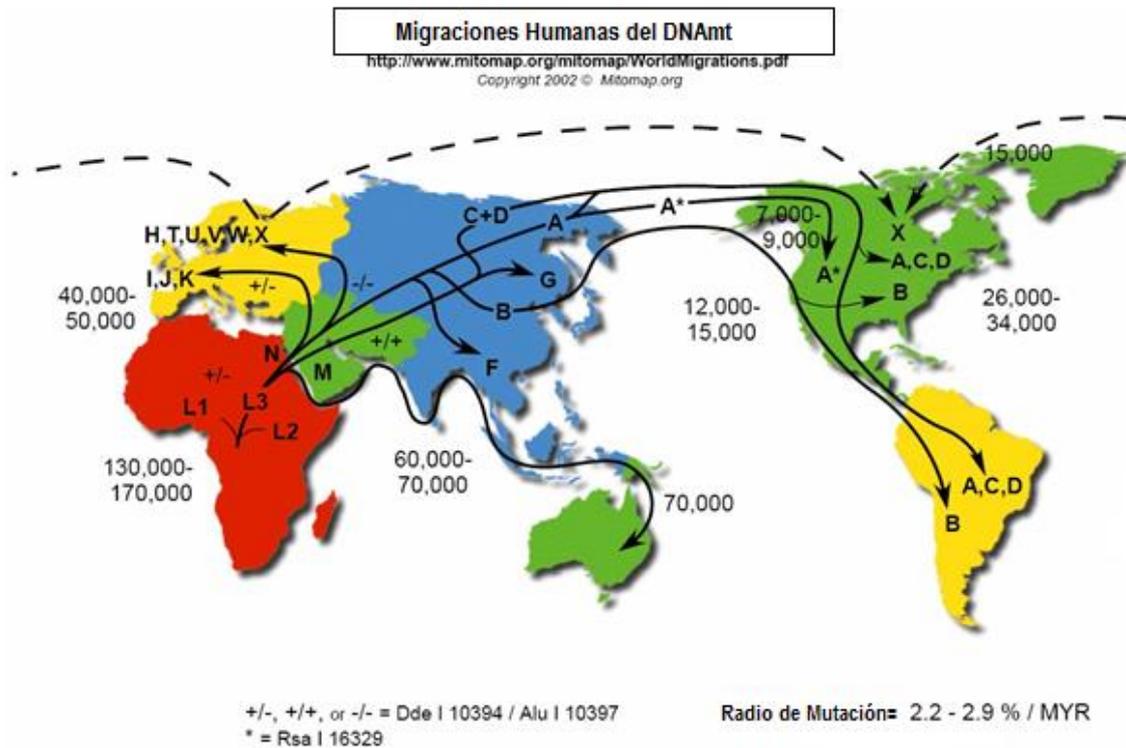


Figura 1. 4. Migraciones humanas del mtDNA. Modificado de mitomap.org (<http://www.mitomap.org/mitomap>).

En México se han estudiado diferentes poblaciones nativas usando varios marcadores genéticos y los resultados han mostrado la mezcla genética indígena, europea y africana. Un estudio reciente mostró que los grupos Huichol y Tarahumara no tienen el haplogrupo A o lo tienen en una baja frecuencia. Por otro lado, los grupos de la Mixteca-Alta, Nahua-Necoxtla, Nahua-Actopan, Nahua-Chilacachapa y Nahua-Zitlala tienen al menos los haplogrupos D y B. Los Nahua-Ixhuatlancillo, Otomí, Nahua-Xochimilco, Mixteca-Baja, Tzeltal y Nahua-Coyolillo tienen al menos el haplogrupo C. El grupo Purépecha tiene una frecuencia baja de los haplotipos D, B y C. También se encontró que el grupo Nahua-Coyolillo (localizado cerca del Golfo de México), fue el único grupo indígena con otro haplogrupo (haplogrupo L), presentando una mezcla africana. De acuerdo con estos resultados, una distribución heterogénea de los haplogrupos mitocondriales A, B, C y D está presente entre las poblaciones indígenas mexicanas excepto la Nahua-Coyolillo. (Peñaloza et al., 2007).

Tabla 1. 3. Haplogrupos nativo-americanos. (Richards et al., 1998).

| Haplogrupo Nativo-Americano | Nucleótido | RFLP | Oligos Ubicación | Oligos Secuencia (5'-3') |
|-----------------------------|--------------------|-----------------|------------------|--|
| A | C16290T G16319A | HaeIII+663 | L396 H1067 | CCAGCCTAACCAGATTTCAA GGGGTATCTAATCCCAGTTT |
| B | 16189C 16217C | Del. 9-bp | L8192 H8361 | GCTCTGAAATCTGTGGAG TATTTAGTTGGGGCATTTCAC |
| C | 16298C 16327T | Alu I +13262 | L12978 H13733 | CAAGCCTCACCCACTACTA GGTAGAGGGGGATTGTTGTT |
| D | | Alu I -5176 | L5042 H5442 | CCCACATAGGATGAATAATA GCGATGAGTGTGGGGAGGAA |

En el cáncer prostático el estudio de los haplogrupos del mtDNA ha sido de gran interés ya que representa un biomarcador para el potencial de este padecimiento en una población. El creciente número de publicaciones que describen el riesgo de la asociación del cáncer con varios tipos de haplogrupos mitocondriales en la población humana ha cuestionado la validez de las mutaciones descritas como futuros biomarcadores. (*X.Y, Li et al, 2011*).

Varias investigaciones han relacionado la susceptibilidad del cáncer de próstata con el origen étnico de los individuos lo que podría sugerir una relación entre la variabilidad de la población y la genética del cáncer (*L.T. Amundadottir et al, 2006*). Los estudios anteriores han demostrado que la incidencia es de dos a diez veces mayor en los norteamericanos de ascendencia africana, en comparación con los caucásicos y los asiáticos, respectivamente (*J.E. Fowler et al 2000*). En este sentido, las observaciones de Booker y Col., han demostrado que el haplogrupo U (origen europeo) se asocia con el doble de riesgo de cáncer de próstata y 2.5 veces el riesgo de carcinoma renal en individuos estadounidenses que tienen ascendencia europea (*Booker et al, 2006*).

Contrariamente a este hallazgo, las investigaciones de Kim y Col., no reveló ninguna asociación entre linajes asiáticos y el cáncer de próstata para la población coreana (*Kim et al, 2008*). Del mismo modo, los hallazgos por Muller y Col., no relacionaron la asociación entre estos haplogrupos y el cáncer prostático en una población europea (*Muller et al, 2009*).

En México y los demás países latinoamericanos no se ha llevado a cabo ningún estudio en las poblaciones latinoamericanas mezcladas para tratar de asociar linaje materno (haplogrupo ADNmt) con la susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata, lo que sería de gran interés, ya que estas poblaciones mezcladas se forman históricamente por tres grandes grupos geográficos humanos: nativos estadounidenses, europeos y africanos (Cano et al, 2014).

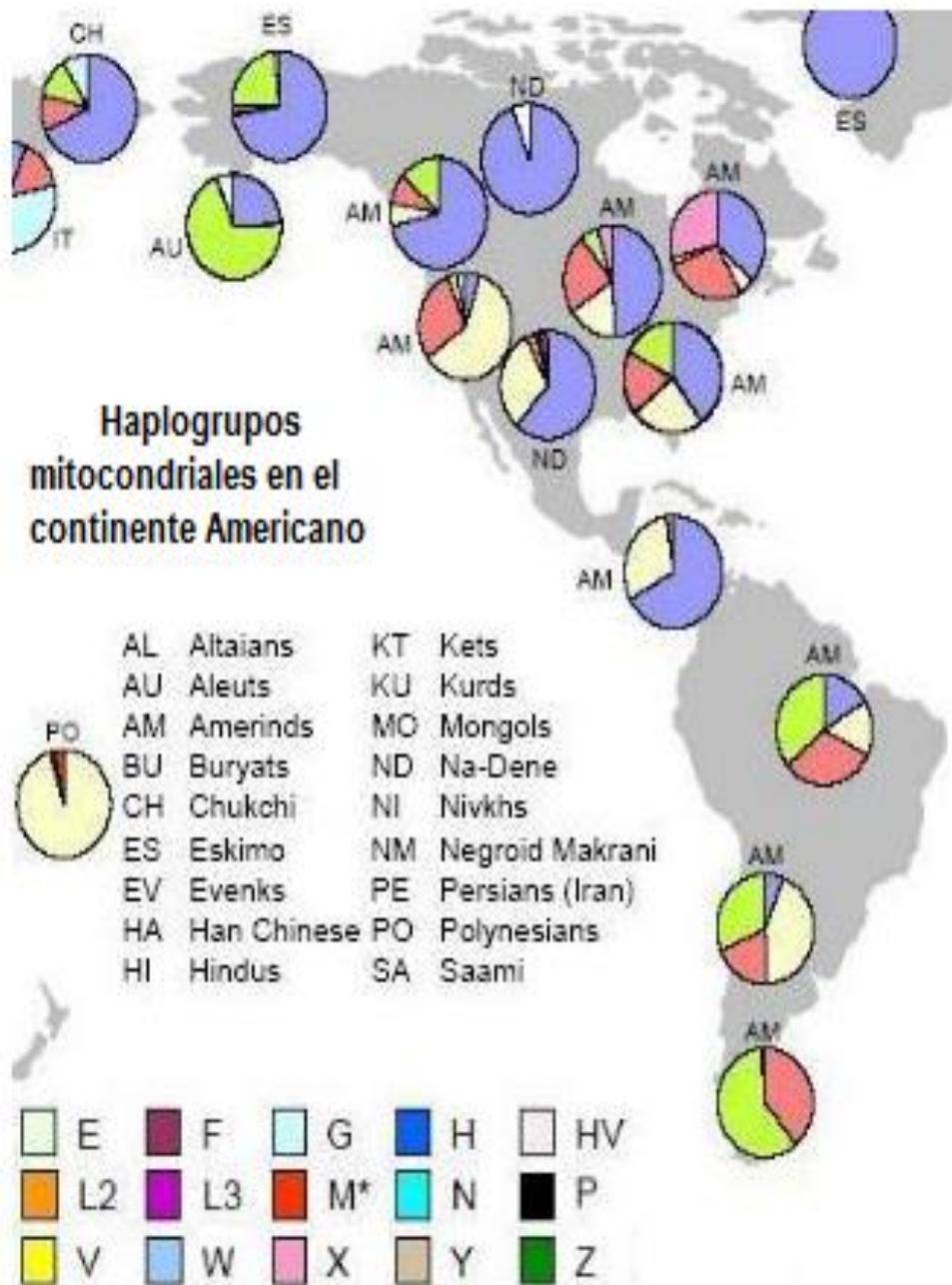


Figura 1. 5. Haplogrupos Mitocondriales en el continente americano. Modificado de mitomap.org (<http://www.mitomap.org/mitomap>)

CAPÍTULO II CÁNCER DE PRÓSTATA

2.1 Panorama Nacional.

El cáncer de próstata es un importante problema de salud pública con altos costos sociales y una considerable carga individual para el paciente. En México, este tipo de neoplasia se ha convertido en un problema de salud pública, ya que al año se observa una tasa de mortalidad de 121.57 por cada 100 mil hombres lo que representa el 8.1% de defunciones, en la población de hombres de 60 años (SS-DF, 2010).

En 2010 el Sistema de Salud capitalino reportó un total de 8 mil 575 detecciones de cáncer de Próstata; mil 489 detecciones positivas de crecimiento prostático (Hiperplasia Prostática) y 15 mil 614 detecciones negativas. Las estadísticas colocan al cáncer de Próstata como la tercera causa de muerte en los hombres; en el Distrito Federal, y en los últimos dos años se ha incrementado en al menos 30% (SS-DF, 2010).

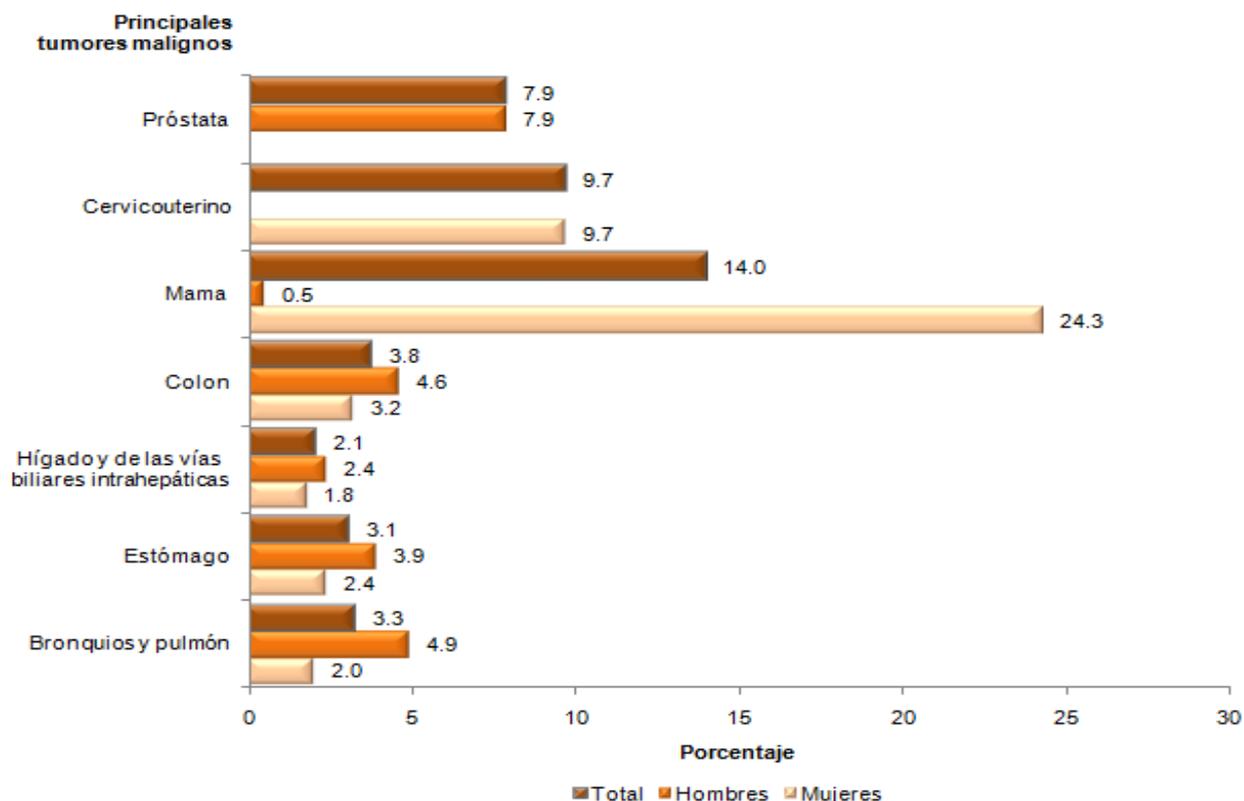
Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo, 2006

| Tipo de tumor maligno | Hombres | Mujeres |
|-------------------------------------|--------------|--------------|
| Total | 100.0 | 100.0 |
| Del estómago | 4.0 | 2.7 |
| Del colon | 3.7 | 2.8 |
| Del rectosigmoides, recto y ano | 2.4 | 1.8 |
| Tráquea, bronquios y pulmón | 6.0 | 2.6 |
| Mama | 0.4 | 19.8 |
| Cuello del útero | 0.0 | 13.1 |
| Leucemias | 18.8 | 11.9 |
| Labio, cavidad bucal y faringe | 2.3 | 1.2 |
| Esófago | 1.5 | 0.4 |
| Hígado | 2.4 | 1.9 |
| Páncreas | 1.9 | 1.5 |
| Melanoma y otros tumores de la piel | 0.8 | 0.8 |
| Cuerpo del útero | 0.0 | 2.8 |
| Ovario | 0.0 | 7.3 |
| Próstata | 7.8 | 0.0 |
| Vejiga | 2.9 | 0.9 |
| Otros | 45.1 | 28.7 |

Fuente: SSA, DGIS. Egresos Hospitalarios, 2006. Base de datos. Procesó INEGI.

Figura 2. 1. Distribución de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno por cada sexo. (Tomado del Programa de Acción del Cáncer de Próstata, Secretaría de Salud, 2009).

**Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo
2010**



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C16, C18, C22, C34, C50, C53 y C61.

Fuente: SSA (2011). Base de egresos hospitalarios 2010. Procesó INEGI.

Figura 2. 2. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según el sexo. (Tomado de SSA, 2011. Base de Egresos Hospitalarios 2010).

2.2 Neoplasia Prostática.

Para entender el cáncer de próstata, resulta útil conocer algo sobre la próstata y las estructuras adyacentes en el cuerpo.

2.2.1. Información sobre la próstata.

La próstata es una glándula que se encuentra presente sólo en los hombres. Se encuentra delante del recto y debajo de la vejiga. El tamaño de la próstata varía con la edad. En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño aproximado de una nuez. Sin embargo, puede ser mucho más grande en hombres de más edad (ACP, 1997).

La función de la próstata consiste en producir cierta cantidad del líquido que protege y nutre a los espermatozoides presentes en el semen. Esto causa que el semen sea más líquido. Justo detrás de la próstata se encuentran las glándulas llamadas *vesículas seminales*, las cuales producen el mayor volumen de líquido para el semen. La *uretra*, que es el conducto que transporta la orina y el semen fuera del cuerpo a través del pene, pasa por el centro de la próstata (ACP, 1997).

La próstata comienza a desarrollarse antes del nacimiento, y su crecimiento se acelera durante la pubertad ya que es promovido por hormonas masculinas (llamadas andrógenos) que hay en el cuerpo. El andrógeno principal, la *testosterona*, se produce en los testículos. La enzima *5-alfa reductasa* transforma la testosterona en *dihidrotestosterona* (DHT) que es la hormona principal que le envía una señal a la próstata para que crezca. Mientras las hormonas masculinas estén presentes, por lo general el tamaño de la próstata permanece casi igual o crece lentamente en los adultos (ACP, 1997).

2.2.2. Hiperplasia prostática benigna.

A medida que el hombre envejece, la parte interior de la próstata (alrededor de la uretra) a menudo sigue creciendo, lo que puede causar una condición común llamada *hiperplasia prostática benigna* (*benign prostatic hyperplasia*, BPH). Cuando se presenta esta afección, el tejido de la próstata puede presionar la uretra, lo que causa problemas al pasar la orina (Baldwin et al, 2001).

La BPH no es cáncer ni se convierte en cáncer, aunque puede ser un problema de salud grave para algunos hombres. Si se requiere tratamiento, a menudo se pueden usar medicinas para reducir el tamaño de la próstata o para relajar los músculos que se encuentran en ésta, lo que usualmente ayuda a que la orina fluya. Si las medicinas no son útiles, puede que sea necesario emplear algún tipo de cirugía, tal como una resección transuretral de la próstata (Baldwin et al, 2001).

2.2.3 Cáncer de próstata.

En la próstata se encuentran varios tipos de células, pero casi todos los casos de cáncer de próstata se desarrollan a partir de las células glandulares. Las células

glandulares producen el líquido de la próstata que se agrega al semen. El término médico para un cáncer que comienza en las células glandulares es *adenocarcinoma*. Otros tipos de cáncer también pueden comenzar en la glándula prostática, incluyendo sarcomas, carcinomas de células pequeñas, y carcinomas de células de transición. Pero estos tipos de cáncer de próstata no son frecuentes. Algunos cánceres de próstata pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría crece lentamente (*Fogg et al, 2001*).

2.2.4. Posibles afecciones precancerosas de la próstata: Neoplasia Prostática Intraepitelial y Atrofia Inflamatoria Proliferativa.

Algunos médicos creen que el cáncer de próstata comienza con una afección precancerosa, aunque esto aún no se conoce con certeza (*Byrne et al, 1992*).

En esta afección, existen cambios microscópicos en la apariencia de la glándula prostática, pero las células anormales no parecen invadir otras partes de la próstata (como lo harían las células cancerosas). Basándose en cuán anormales se ven los patrones de las células, se clasifican de la siguiente forma:

- **PIN de bajo grado:** los patrones de las células de la próstata lucen casi normales.
- **PIN de alto grado:** los patrones de las células lucen más anormales.

Esta afección comienza a aparecer en la próstata de algunos hombres tan temprano como entre los 20 y los 29 años de edad. Casi la mitad de todos los hombres tienen neoplasia prostática intraepitelial (*prostatic intraepithelial neoplasia*, PIN) al cumplir los 50 años. Muchos hombres comienzan a presentar una neoplasia de bajo grado a una edad temprana, pero no necesariamente padecen cáncer. Aún no está clara la importancia de la neoplasia prostática intraepitelial de bajo grado con respecto al cáncer de próstata. Si en una biopsia de la próstata se reporta un hallazgo de PIN de bajo grado, el seguimiento para los pacientes usualmente es el mismo al que se daría si nada anormal se hubiese reportado (*Byrne et al, 1992*).

Si se encuentra una neoplasia prostática intraepitelial de alto grado en una biopsia de próstata, hay aproximadamente entre 20% a 30% de probabilidades de que él paciente tenga cáncer en otra área de la próstata. Por esta razón, los médicos a menudo observan cuidadosamente a los hombres con neoplasia prostática intraepitelial de alto grado y pueden recomendar la repetición de una biopsia de la próstata, especialmente si la biopsia original no tomó muestras de todas las partes de la glándula (*Byrne et al, 1992*).

La atrofia inflamatoria proliferativa (*proliferative inflammatory atrophy*, PIA) es otro hallazgo que se puede notar en una biopsia de próstata. En esta afección, las células de la próstata lucen más pequeñas de lo normal, y existen signos de inflamación en el área. La PIA no es cáncer, pero los investigadores creen que algunas veces puede convertirse en una PIN de alto grado o tal vez en cáncer de próstata directamente (*Byrne et al, 1992*).

2.3 Factores de Riesgo del Cáncer de Próstata.

Un factor de riesgo es cualquier cosa que afecte la posibilidad de tener una enfermedad como el cáncer. Los distintos tipos de cáncer tienen distintos factores de riesgo. Algunos factores de riesgo, como el fumar, pueden cambiarse. Otros, como la edad de la persona o sus antecedentes familiares, no se pueden cambiar (*Hsing, 2006*).

Sin embargo, los factores de riesgo no suministran toda la información. Muchas personas con uno o más factores de riesgo nunca padecen cáncer, mientras que otras que padecen la enfermedad puede que hayan tenido pocos factores de riesgo conocidos o ninguno de éstos (*Hankey et al, 2006*).

Aún no se ha entendido completamente las causas del cáncer de próstata, pero se han encontrado varios factores que pueden cambiar el riesgo de padecer esta enfermedad. Sin embargo, para algunos de estos factores, la asociación con el riesgo de cáncer de próstata aún no está clara (*ASC, 2012*).

2.3.1. Genética.

Los antecedentes genéticos pueden contribuir al riesgo de cáncer de próstata, según lo sugerido por las asociaciones con la raza, la familia, y las variantes genéticas específicas.

2.3.2. Familia.

Los hombres que tienen un familiar de primer grado (padre o hermano) con cáncer de próstata tienen el doble de riesgo de desarrollarlo, y los que tienen dos familiares de primer grado, en especial hermanos afectados tienen un riesgo cinco veces mayor en comparación con los hombres sin antecedentes familiares (*Steinberg et al, 1999*). Este hecho se refuerza en un estudio realizado en los países nórdicos con hombres gemelos, reveló un 40% de probabilidad de riesgo de desarrollar dicha patología por factores de consanguinidad estrecha (*Lichtenstein et al, 2000*).

2.3.3. Raza.

El cáncer de próstata afecta más comúnmente en los hombres negros que los blancos o hispanos, y también se presenta más alta tasa de mortalidad. Por el contrario, El cáncer de próstata ocurre con menos frecuencia en los hombres asiático-americanos y en los hispanos/latinos que en los hombres blancos. No están claras aún las razones de estas diferencias raciales y étnicas (*Hoffman et al, 2001*).

2.3.4. Variantes genéticas específicas.

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, factores de riesgo importantes para el cáncer de ovario y cáncer de mama en las mujeres, también han sido implicados en el cáncer de próstata. Otros genes ligados son, el gen hereditario del cáncer de próstata 1 (HPC1), el receptor de andrógenos, y el receptor de la vitamina D (*Struewing et al, 1997*).

Sin embargo, hay muchas otras mutaciones genéticas que pudieran ser responsables de algunos casos de cáncer de próstata hereditario, pero se están realizando investigaciones sobre estos genes (*ASC, 2012*).

La mayoría de las mutaciones del ADN relacionadas con el cáncer de próstata no parecen ser heredadas, sino que se forman durante el transcurso de la vida de un hombre. Cada vez que una célula se prepara para dividirse en dos nuevas células debe copiar su ADN. Este proceso no es perfecto y algunas veces ocurren errores, lo que deja el ADN con imperfecciones en la célula nueva (*Beuzebec et al, 2009*).

El desarrollo del cáncer de próstata puede estar asociado con un aumento en los niveles de ciertas hormonas. Los niveles altos de andrógenos (hormonas masculinas, como la testosterona) promueve el crecimiento de las células de la próstata, y pueden contribuir al riesgo de cáncer de próstata en algunos hombres (*Smith et al, 2009*).

2.3.5. Edad.

El cáncer de próstata ocurre en muy pocas ocasiones en hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. Casi dos de tres casos de cáncer de próstata se detectan en hombres mayores de 65 años. Sin embargo, muchos hombres que tienen cáncer de próstata nunca lo saben (*Andriole et al, 2009*).

En 1977 se realizó un estudio sobre la latencia del cáncer de próstata en China, Alemania, Israel, Jamaica, Suecia y Uganda reveló que los hombres de 50 años, el 30% ya tenía una neoplasia prostática y los de 70 años era casi del 80% con dicha patología, cabe resaltar que estos pacientes murieron por otras causas (*Breslow et al, 1977*).

2.3.6. Tipo de Dieta y Obesidad.

No está claro cuál es el papel exacto que desempeña la alimentación en el desarrollo del cáncer de próstata, aunque se han estudiado varios factores.

Los hombres que comen muchas carnes rojas o productos lácteos altos en grasa parecen tener una probabilidad ligeramente mayor de cáncer de próstata. Estos hombres también tienden a comer menos alimentos de origen vegetal como frutas, ensaladas y verduras (*Ornish et al, 2005*).

Algunos estudios han sugerido que los hombres que consumen una gran cantidad de calcio (proveniente de alimentos o complementos) pueden tener un mayor riesgo de padecer un cáncer de próstata. Es importante indicar que el calcio proporciona otros beneficios importantes a la salud (*ACS, 2012*).

Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), México es el segundo país con más porcentaje de obesidad (*OCDE, 2012*), lo cual implica un riesgo para el inicio del cáncer de próstata. En 2013, el Dr. Andrew Rundle, de la Universidad de Columbia, New York, declaró “La obesidad incrementa un 100% el riesgo de Cáncer de Próstata agresivo. En su estudio, los pacientes obesos (IMC > 30) se observó la presencia de lesiones PIN en muestras de biopsias transrectales, ya antes explicadas, las cuáles son precursoras del cáncer de próstata (*Rundle, 2013*).

2.3.7. Factores Sexuales.

Varios estudios han demostrado que el tener muchas parejas sexuales o el inicio de la actividad sexual a temprana edad incrementa sustancialmente el riesgo de cáncer de próstata (*Denis et al, 2002*). Hay una relación significativa entre el cáncer de próstata y la infección por HPV (HPV-16, HPV-18), (*Sarma et al, 2006*).

2.4 Signos y Síntomas.

Por lo general, el cáncer de próstata en etapa inicial no causa síntomas. Algunos cánceres de próstata avanzados pueden hacer más lento o debilitar el flujo urinario o hacerle sentir que necesita orinar con más frecuencia, especialmente de noche. Sin embargo, las enfermedades no cancerosas de la próstata, tal como la hiperplasia prostática benigna son una causa más común de estos síntomas (Giovanucci, 2006).

Si el cáncer de próstata se encuentra en una etapa avanzada, es posible que tenga sangre en la orina (*hematuria*) o tenga dificultad para lograr una erección (*impotencia*). El cáncer de próstata avanzado usualmente se propaga a los huesos, lo que puede causar dolor en las caderas, la espalda (columna vertebral), el pecho (las costillas) u otras áreas. El cáncer que se ha propagado a la columna vertebral también puede presionar los nervios espinales, lo que puede causar debilidad o adormecimiento en las piernas o los pies, o incluso pérdida en el control de la vejiga o los intestinos (Giovanucci, 2006).

2.5 Fisiopatología.

El cáncer de próstata sólo presenta síntomas cuando su tamaño rebasa el tamaño normal y tiene algún grado de invasión, por esto debemos evaluar la sintomatología prostática y cuando se requiera pedir un antígeno prostático específico a todo hombre mayor de 50 años, de acuerdo a sus factores de riesgo determinar la periodicidad y siempre que presenten factores de riesgo, o encuesta de factores de riesgo positiva, examinar con tacto rectal. Esto es válido para cualquier médico, de cualquier especialidad (Beardsle et al, 1994).

En hombres con mayor riesgo, con antecedentes familiares directos de cáncer de próstata o de mama, se debe iniciar un abordaje de detección a los 40 años (Andreu, 2004).

La próstata es un órgano pequeño del tamaño de una nuez. Se localiza debajo de la vejiga y rodea la uretra. La próstata produce un líquido que se convierte en parte

del semen. El semen es el líquido blanco que contiene espermatozoides, por tanto es un órgano exclusivo del género masculino (Holtgrewe, 2001).

Fundamentalmente se distinguen 3 zonas: la zona Central cruzada por los conductos eyaculadores que supone un 25% de la glándula, la zona Transicional que rodea a la uretra posterior con un 5% del volumen glandular y la zona Periférica que ocupa un 70% del volumen glandular (ASC, 2012).

En la zona Periférica se desarrollan el 68% de los cánceres, en la zona Central un 8% y en la zona Transicional un 24%. La zona Periférica es accesible al tacto rectal mientras que los tumores que se desarrollan en las zonas Central y Transicional se valoran mejor con la ecografía (Howlader, 2001).

La prevalencia de cáncer prostático en especímenes de autopsia varía poco alrededor del mundo, la diferencia clínica es notable entre países (alta en Norteamérica y países europeos, intermedio en Sudamérica y baja en el Lejano Oriente), sugiriendo que las diferencias en el medio ambiente y en la dieta entre las poblaciones, podrían ser de importancia en el desarrollo del cáncer prostático (Howlader, 2001).

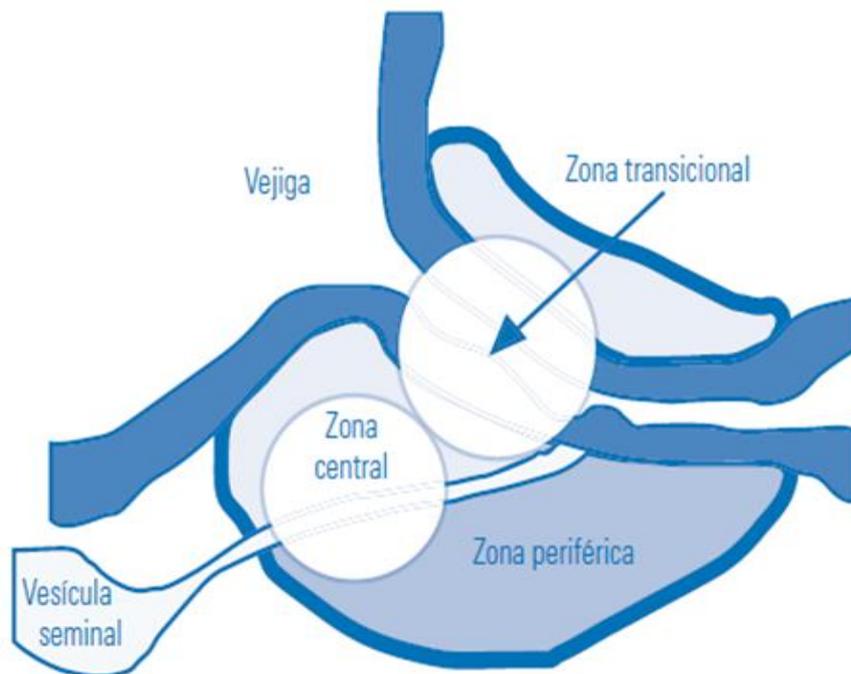


Figura 2 .3. Glándula Prostática. (Tomado del Programa de Acción del Cáncer de Próstata, SSA, 2009).

2.6 Alteraciones Mitocondriales en el Cáncer de Próstata.

Se han identificado mutaciones a nivel del DNA mitocondrial (mtDNA) humano asociados a varios tipos de cáncer. A continuación se presenta una tabla resumida de las mutaciones encontradas en las regiones no codificantes y codificantes del mtDNA en células cancerígenas de la glándula prostática.

Tabla 2. 1. Mutaciones Mitocondriales asociadas al Cáncer de Próstata. (Jerónimo et al, 2001).

| Región/Genes Mutados | Heteroplásmica/Homoplásmica | Afección al Complejo Respiratorio | Referencias |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Dloop | Homoplásmica | Ninguna | <i>Jerónimo et al, 2001.</i> |
| 16S rRNA | Homoplásmica | Ninguna | <i>Jerónimo et al, 2001.</i> |
| ND1 | Homoplásmica | Complejo I | <i>Jerónimo et al, 2001.</i> |
| ND4 | Homoplásmica | Complejo I | <i>Jerónimo et al, 2001.</i> |

Aunque a la fecha no se han reportado alteraciones en el mtDNA en el cáncer de próstata. Dos recientes estudios sugieren que las mutaciones y deleciones en el mtDNA juegan un papel clave en la carcinogénesis de la próstata. El primer estudio examina las deleciones en el mtDNA en 34 biopsias malignas de próstata. El genoma mitocondrial fue enteramente amplificado usando la técnica de PCR larga usando geles de electroforesis para visualizar el tamaño de dicha alteración. Los investigadores encontraron un número significativamente elevado de deleciones que incrementan con la edad (*Jessie, et al, 2001*).

Por otro lado, el estudio realizado por Jerónimo y Col., secuenciaron las regiones D-loop, 16S rRNA y la subunidad NADH de lesiones premalignas de la glándula prostática, tumores de próstata primarios, y los linfocitos normales de 16 pacientes. Las mutaciones se identificaron en 3/16 pacientes. A pesar de la incidencia relativamente poco frecuente de mutaciones en el mtDNA, se encontraron que las dichas pueden ocurrir tempranamente en la progresión de la

enfermedad y fueron detectables hasta en fluidos corporales durante las primeras etapas de la enfermedad (*Jerónimo et al, 2001*).

El DNA mitocondrial (mtDNA) es el principal objetivo ataque para las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se ha observado que el nivel de daño oxidativo es más extensa y persistente en este que en el genoma nuclear, lo que conduce a la acumulación de un mayor número de mutaciones (*Croteau y Borh, 1997*).

El cáncer de próstata y los cambios aberrantes en las especies reactivas de oxígeno (ROS) se vuelven más comunes con el envejecimiento, dichas especies reactivas de oxígeno (ROS) son cruciales en la iniciación de un proceso tumoral. En el caso de una próstata normal, una mayor concentración de zinc presente en el tejido provoca un bloqueo en el ciclo de Krebs y la acumulación de citrato en el líquido prostático. De este modo, las células epiteliales normales de la próstata glandular tienen una baja respiración oxidativa baja provocando una disminución en la oxidación y presumiblemente menos producción de ROS. A diferencia de la próstata normal, la transformación maligna se asocia con un interruptor metabólico temprano que conduce a la acumulación de zinc disminuyó, y el aumento de la oxidación de citrato. Por lo tanto en el proceso hay un aumento en la respiración oxidativa y una tasa alta de ROS (*Cook and Higuchi, 2012*).

Estudios recientes han demostrado que la presencia de múltiples mutaciones puntuales homoplásmicas en el genoma mitocondrial es común en muchos tumores humanos, tales como las que se encuentran en los cánceres de colon y de próstata (*Chen et al, 2002*). Estas mutaciones también pueden llevar a la disfunción mitocondrial debido a la alteración del metabolismo intermediario, lo que podría interpretarse como una señal para la inducción de la patogénesis del tumor (*Dakubo et al, 2006*).

La ubicación de estas mutaciones en el genoma se ha correlacionado con diferentes tipos de cáncer. La presencia de mutaciones en el gen de la citocromo oxidasa I (COI) se produce en alrededor de 11% de los pacientes de cáncer de próstata (*Petros et al, 2005*). Por otra parte, el bucle de desplazamiento de la región no codificante (D-loop) resulta ser un sitio crítico para la presencia de mutaciones (hotspot) en las neoplasias de la vejiga, pulmón, cabeza y cuello. Estas mutaciones

están asociadas con la función D - bucle como un sitio regulador para la replicación y la expresión de este genoma (Petros et al, 2005).

El Dr. Douglas Wallace, experto en el genoma mitocondrial, afirma que la deficiencia de energía y la generación de especies reactivas de oxígeno ROS provocan una disfunción mitocondrial en el genoma mitocondrial jugando un papel central en una amplia gama de trastornos relacionados con la edad y diversas formas de cáncer (Wallace, 2012). Fogg y Col., mencionaron tres procesos que involucran a la mitocondria en la iniciación y progresión tumoral en el cáncer de próstata: a través de las alteraciones del metabolismo de la glucosa (efecto Warburg), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (derivadas de la fosforilación oxidativa, proceso donde las mitocondria generan energía y consiste en la oxidación del hidrógeno para generar agua y ATP) (Pereira et al., 2012) y el compromiso de la función intrínseca en la apoptosis (Fogg et al., 2011).

En 2008 se encontró una delección de 3.4 kb en el genoma mitocondrial en biopsias negativas para pronóstico de cáncer de próstata (Maki, et al., 2008), este estudio se corroboró en 2010, en el cual encontraron delecciones en el genoma mitocondrial que tienen utilidad en resolver los falsos negativos de las biopsias prostáticas. Estos estudios demuestran la importancia de un biomarcador mitocondrial útil para el diagnóstico temprano y progresión del cáncer de próstata (Robinson, et al., 2010). Algunas mutaciones están relacionadas directamente al conocimiento de haplogrupos implicados en la asociación entre variantes del mtDNA y enfermedades complejas como cáncer renal y de próstata (Booker et al., 2006).

La delección de 3.4 kb asociada al cáncer de próstata, provoca una remoción en la región terminal ND4L y toda la subunidad ND4 tocando una parte de la subunidad ND5 (Maki et al., 2008 Robinson et al., 2010).

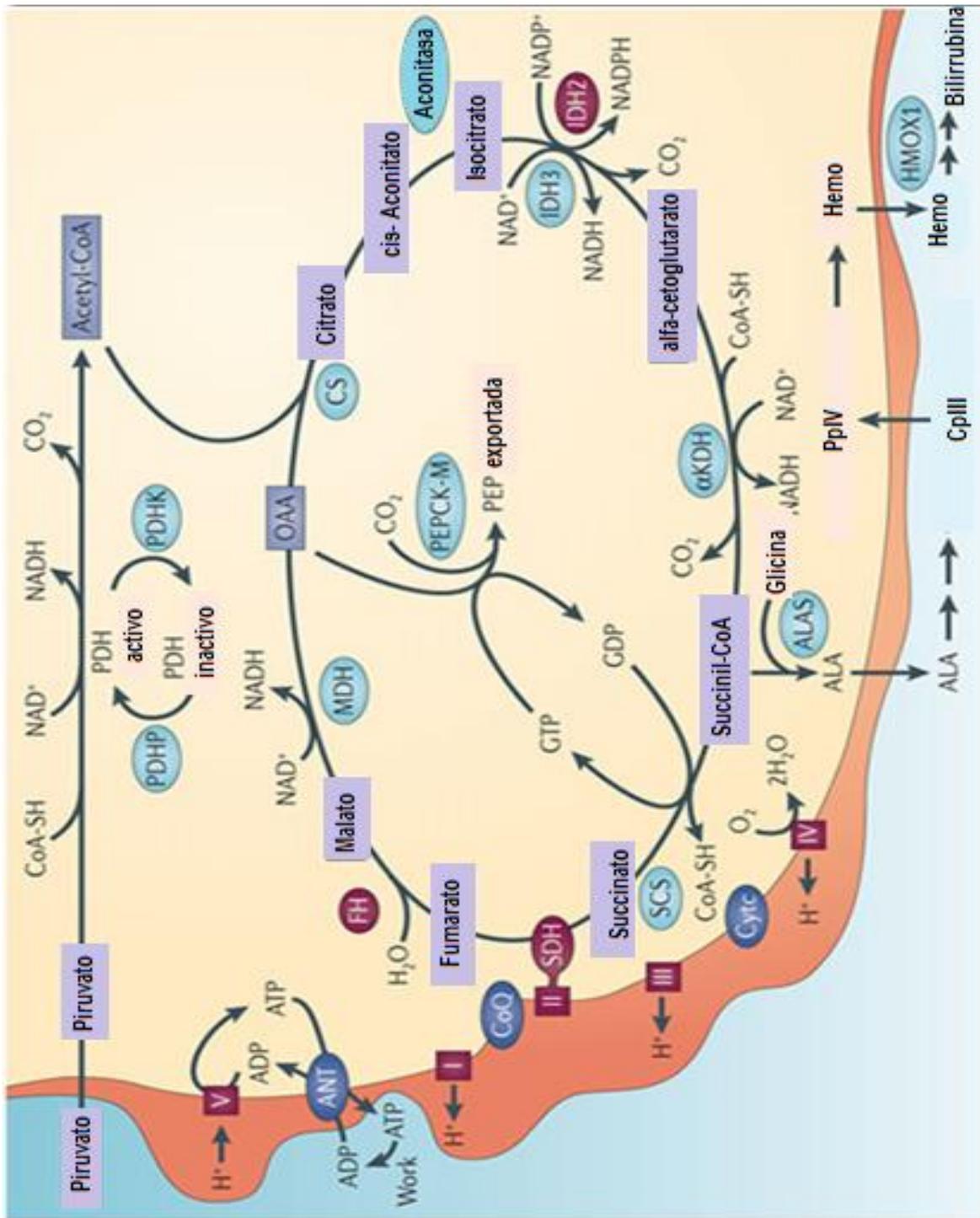


Figura 2. 4. Bioenergética y Mutaciones Mitocondriales. Modificado de Cold Spring Harbor Laboratory Press. (Wallace, 2012).

En las células cancerígenas el mtDNA se encuentra alterado por lo que muchas mutaciones en el mtDNA están estrechamente asociadas a las fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la regulación REDOX de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). (Wallace, 2012).

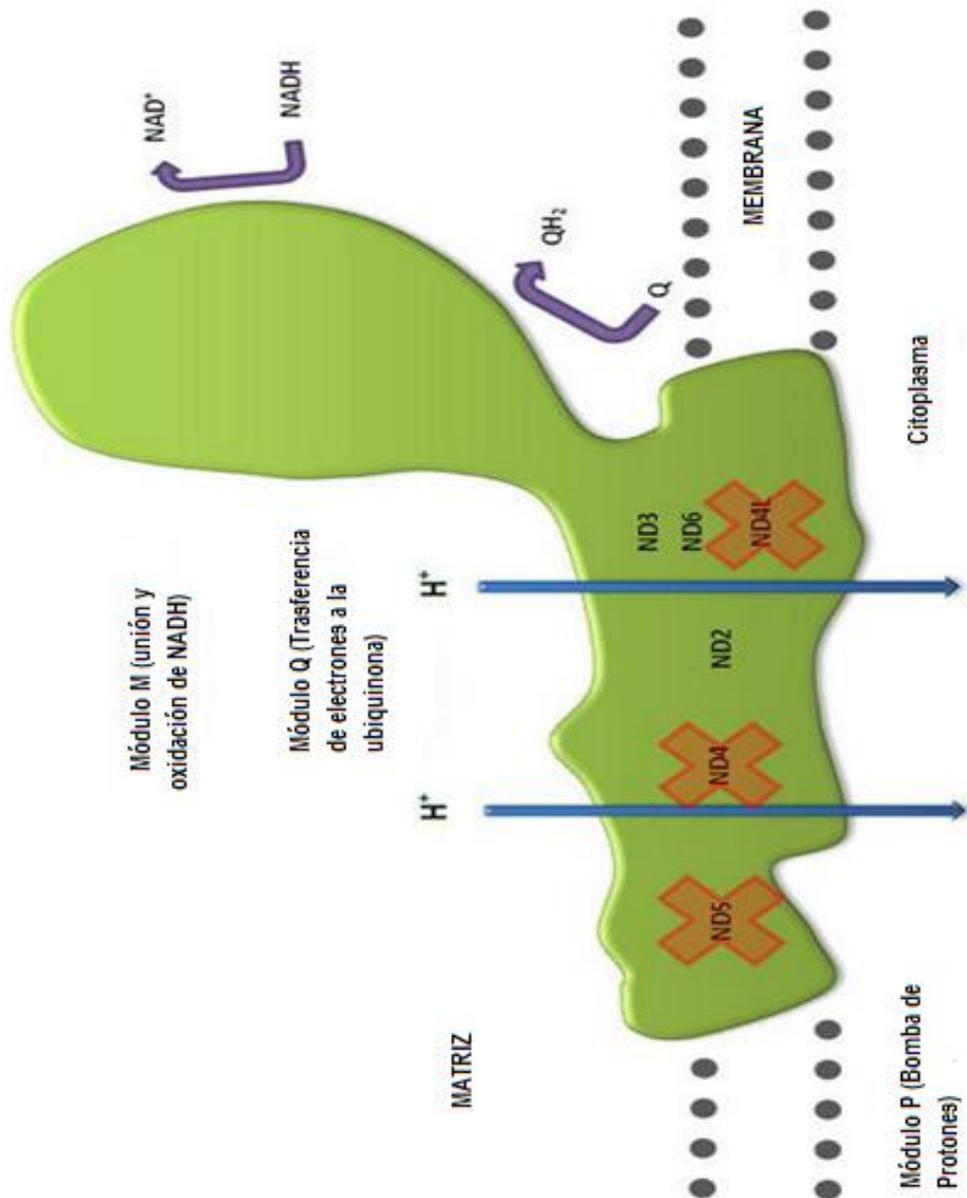


Figura 2. 5. Complejo I y Subunidad NADH mitocondriales. (Wallace, 2012).

Se muestra la afección por la delección 3.4 kb en las zonas ND5, ND4, ND4l del mtDNA (Parr et al, 2013). Se presume que los genes dañados por la delección 3.4kb están asociados a un fallo de transferencia de electrones y de unión a la ubiquinona, lo que puede implicar un incremento en la concentración de súperoxido (O_2^*) similar a la observada cuando el sitio de unión de la ubiquinona es inhibido por otra proteína denominada, rotenona (Murphy, 2009); sin embargo, este efecto se limita únicamente a las mitocondrias con dicha afectación. (Wallace, 2012).

CAPÍTULO III DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA) y Antígeno Prostático Específico Fracción Libre (PSA-L).

El antígeno prostático específico (PSA), constituye un marcador tumoral para cáncer de próstata, es una glicoproteína de 237 aminoácidos con acción de serinaproteasa, cuyo gen está activado en el cromosoma 19 del ADN de las células epiteliales de ductos y acinos prostáticos y en condiciones normales es secretado hacia el lumen de estas estructuras (Alonso, et al. 2005).

Es sintetizado por la glándula prostática y secretado al líquido seminal donde tiene una función fluidificante asociado a su actividad enzimática (Díaz y García, 2000).

En condiciones normales se encuentran bajas concentraciones de PSA en suero (ng/mL). Estableciendo un rango de referencia de 0 a 4.00 ng/dL (Wein, et al. 2008).

El PSA es producido tanto por las células normales de la próstata como, prostatitis (inflamación de la próstata) e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), o con un crecimiento maligno (canceroso) en la próstata. (SS-DF, 2001).

Se considera niveles altos cuando PSA se encuentra por encima de 4ng/dL, cabe mencionar que la eyaculación puede causar una elevación transitoria menor de 1ng/dL; dicha prueba cuenta con una sensibilidad que oscila entre 67.5% – 80% y especificidad de 60 a 80% para el cáncer de próstata, aunque puede variar según la edad y los factores de riesgo como raza negra e historia familiar de cáncer de próstata. Por lo que presenta muchos falsos positivos con respecto a la detección del cáncer de próstata (Alonso, et al. 2005).

Algunos factores pueden causar que los niveles de PSA bajen (aun cuando hay cáncer): Ciertos medicamentos usados para tratar la hiperplasia prostática benigna o síntomas urinarios, tal como finasterida (Proscar o Propecia) o dutasterida (Avodart) puede reducir los niveles de PSA. Algunas mezclas de hierbas que son vendidas como suplementos dietéticos también podrían ocultar un

alto nivel de PSA. Así mismo los hombres obesos suelen tener niveles de PSA más bajos.

Cierta investigación reciente ha sugerido que los hombres que toman aspirina regularmente pueden presentar niveles de PSA más bajos. Es posible que este efecto sea mayor en los hombres que no fuman (*ACS, 2012*).

Se han demostrado diversas formas del PSA sérico, el PSA medible aparece como complejo con proteínas (cPSA) o en una forma libre (PSA-L). Se reconocen tres proteínas fijadoras de PSA en sangre, alfa1-antiquimiotripsina (ACT), α -2 macroglobulina (A2M), e inhibidor de α_1 -proteasa (API).

La mayoría del PSA que ingresa al suero está fijado (70%) a estas proteínas. Cuando se fija a A2M todos los epitopos de PSA están emascarados por lo que este complejo, es difícil de medir. El PSA fijado a ACT es inmunoreactivo y se encuentra en mayor concentración (*Wein, et al. 2008*).

Del 5- 35% del PSA se encuentra como PSA-L sin embargo, la fracción libre se reduce selectivamente en patologías tumorales malignas, brindando la relación %PSA libre/PSA total < de 23% una sensibilidad de 69.7 y 92.7% de especificidad para cáncer de próstata (*Alonso, et al. 2005*).

En la práctica clínica se utiliza la medición de esta relación en pacientes cuyos niveles de PSA total se encuentran entre 4y 10 ng/dL; sin embargo, la medición tanto del PSA total como su fracción libre son pruebas de cernimiento, y por tanto, sólo arrojan resultados preliminares para abrir la necesidad innegable de practicar las pruebas concluyentes (*Alonso, et al. 2005*).

Los niveles de antígeno prostático específico han demostrado ser útiles para supervisar la eficacia del tratamiento del cáncer de la próstata, y para controlar la recaída después de que el tratamiento ha terminado (*SS-DF, 2001*).

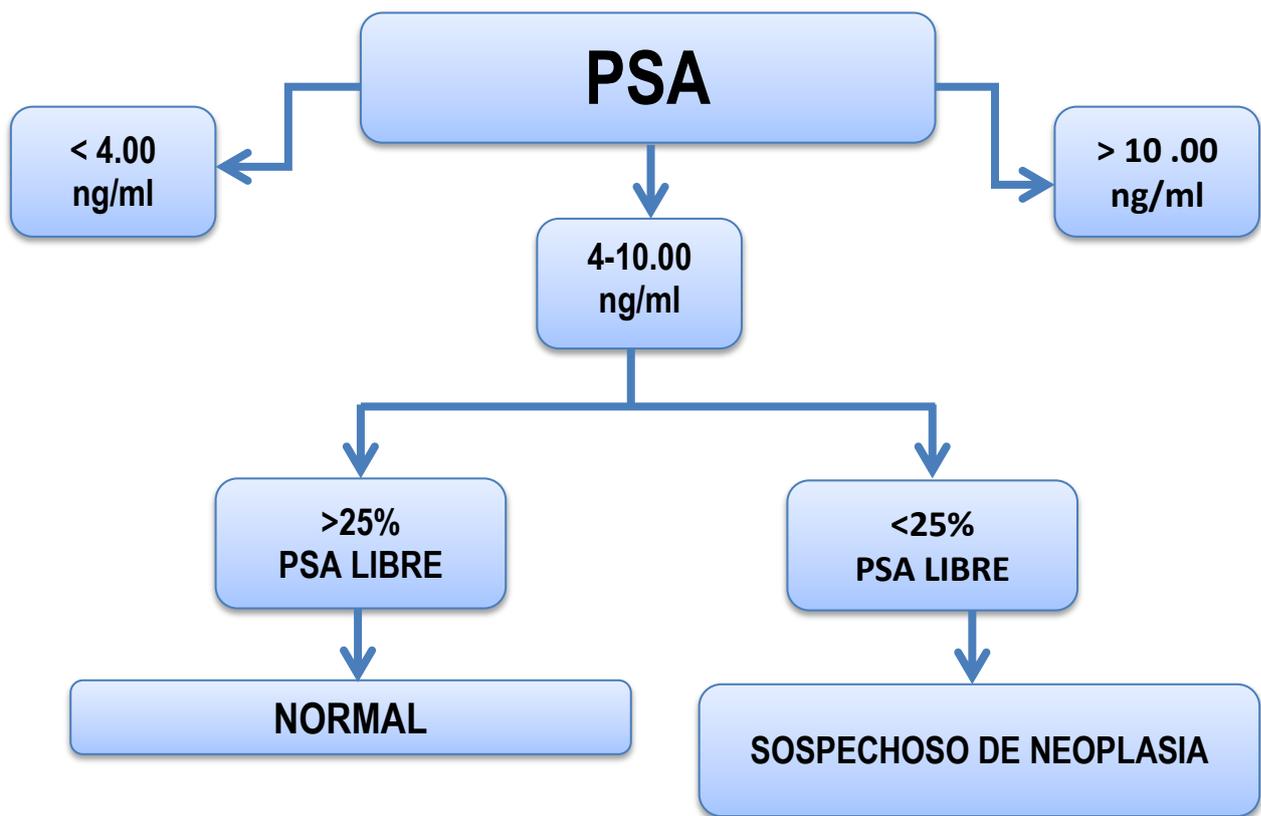


Figura 3. 1. Diagrama de flujo de probabilidad de Cáncer de Próstata por la concentración de Antígeno Específico Prostático (PSA) Total y Libre. (SS-DF, 2001).

Se sugiere realizar determinaciones anuales de APE, pero debido al crecimiento lento del cáncer de próstata podría hacerse a intervalos de 2 años. Presenta beneficios sólo cuando se lo realiza desde los 40-45 años de edad y hasta los 75 años, o hasta los 65 años si presentó determinación persistentemente bajas (entre 0.5 y 1.0 ng/dl).

El tejido prostático hiperplásico o afectado de procesos inflamatorios puede inducir a falsos positivos, por ello se han introducido nuevas valoraciones del APE: la densidad del APE que es el volumen prostático ecográfico/valor del APE (cuando es mayor de 0.15 se recomienda biopsia de próstata) y la velocidad del APE o aumento anual del APE mayor de 0.75 ng/ml, que haría aconsejable la biopsia (SS-DF, 2001).

3.2 Fosfatasa Ácida Prostática (AcP).

La denominación fosfatasa ácida, comprende un conjunto de enzimas ampliamente distribuidas en el organismo. Se origina, principalmente en el hígado posiblemente en el bazo y se encuentra en una amplia variedad de tejidos, como eritrocitos epitelios glandulares de la próstata y testículo, en riñón, pulmón, bazo vejiga, páncreas y aorta (*Díaz, et al. 2000*).

Químicamente se han identificado varias isoenzimas, 3 de ellas en la próstata, pero con especificidad solamente una isoenzima 2, que se conoce con el nombre de Fosfatasa ácida prostática (*Ángel y Ángel, 2006*).

La actividad de la fosfatasa ácida es más de 200 veces más abundante en tejido prostático, que en cualquier otro tejido, y es la fuente de las altas concentraciones de fosfatasa ácida en la eyaculación (*Wein, et al. 2008*).

Se puede detectar en suero por radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoimmunoanálisis (ELISA). Normalmente la AcP no es detectable en un alto porcentaje de pacientes. Cifras comprendidas entre 0.6 ng y 1.0 ng / mL se consideran normales. Sus niveles se elevan cuando la próstata tiene una estructura glandular o quística. Estudios comparativos de la AcP con el PSA, han demostrado mayor sensibilidad en éste último, formando los dos en conjunto, una valiosa herramienta en el seguimiento del diagnóstico y evolución del carcinoma prostático (*Ángel y Ángel, 2006*).

La AcP, como todos los marcadores tumorales se encuentra en relación directa con la masa tumoral y la extensión de la enfermedad (*Ángel y Ángel, 2006*).

3.3 Examen digital del Recto (DRE).

El examen digital rectal (DRE) de la próstata es el método clínico más útil para el diagnóstico de cáncer de próstata siempre y cuando el tumor tenga un volumen que pueda ser palpado por el médico (*Valdivia, et al. 2002*).

El médico introduce un dedo cubierto con un guante lubricado en el recto a fin de palpar cualquier abultamiento o área firme en la próstata que pudiese ser cáncer. Algunas veces el DRE puede ayudar a indicar si el cáncer se encuentra en un solo lado de la próstata, o en ambos lados, o si hay probabilidades de que se haya propagado de la glándula prostática a los tejidos cercanos. También se pueden examinar otras áreas del cuerpo para determinar si el cáncer se propagó a esas áreas (ACS, 2012).

Es importante señalar que en el 70% de los casos el cáncer de próstata se desarrolla en la zona periférica la cual se encuentra al alcance del evaluador. Usando el PSA en combinación con el DRE, los médicos se encuentran con la capacidad de diagnosticar el cáncer de próstata en estadios más tempranos y por ende disminuir la mortalidad y morbilidad de esta enfermedad (Valdivia, et al.2002).

El valor predictivo positivo del tacto rectal alcanza el 40%, de 100 nódulos detectados por el urólogo 40 serán cánceres y el resto corresponderán a Hiperplasia benigna, prostatitis crónica, infartos prostáticos, etc. (SS-DF, 2001).

3.4 Imagenología transrectal.

Los hombres con un resultado de examen digital del recto normal, un nivel de PSA bajo y una puntuación Gleason baja no necesitan otras pruebas, ya que las probabilidades de que el cáncer se haya propagado son muy bajas.

Los estudios por imágenes utilizan ondas sonoras, rayos X, campos magnéticos o sustancias radiactivas para obtener imágenes del interior del cuerpo. Los estudios por imágenes que se usan con más frecuencia para cáncer de próstata incluyen:

3.4.1 Ecografía transrectal.

Es un medio diagnóstico se ha utilizado ampliamente para el estudio de la glándula prostática y como guía - control en la aplicación de diversos tratamientos; es no-invasivo, fácil de realizar, y con el que se obtienen rápidos resultados con mejor visualización de la glándula prostática Es útil para identificar la etapa en que se encuentra el cáncer de próstata ya que

permite ver claramente su grado de infiltración, por ejemplo si sobrepasa o no la cápsula, compromete las vesículas seminales. Permite una muy buena visión de la próstata, se distingue la zona periférica de la transicional. El cáncer se ve como nódulos negros hipogénicos (ACS, 2012).

La ecografía transrectal se indica en los siguientes casos:

- Evaluación de los pacientes con próstata indurada o con elevación del PSA.
- Biopsia ecodirigida de la próstata.
- Estadificación local de los pacientes con cáncer de próstata.
- Monitorización de la respuesta al tratamiento.
- Evaluación de la morfología del ápex prostático.
- Detección de cáncer residual después de tratamiento con Radioterapia.
- Detección de cáncer residual en los pacientes con cáncer de próstata en estadio T1a.
- Detección de recidiva pélvica después de cirugía radical de próstata o vejiga.
- Aplicación de radioterapia intersticial prostática.
- Aplicación de crioterapia transperineal prostática.
- Aplicación transrectal de ultrasonidos de alta frecuencia en la próstata.

3.4.2 Gammagrafía ósea.

Si el cáncer de próstata se propaga a lugares distantes, comúnmente pasa primero a los huesos. Una gammagrafía ósea puede ayudar a mostrar si el cáncer ha alcanzado a los huesos. Se inyecta una pequeña cantidad de material de baja radiactividad en la vena. La sustancia se asienta en las áreas dañadas de los huesos de todo el cuerpo en el transcurso de un par de horas. Después una cámara especial detecta la radioactividad y crea una imagen del esqueleto. Sin embargo, para hacer un diagnóstico preciso, podría ser necesario realizar otras pruebas por imágenes como radiografías regulares, tomografías computarizadas (CT) o imágenes por resonancia magnética (MRI), o incluso una biopsia de hueso (ACS,2012).

3.4.3 Tomografía computarizada.

Procedimiento en el cual se toma una serie de imágenes detalladas del interior del cuerpo, desde ángulos diferentes. Las imágenes son creadas por una computadora conectada a una máquina de rayos X. Se inyecta un tinte en una vena o se ingiere, a fin de que los órganos o los tejidos se destaquen más claramente (INC, 2013).

Esta prueba puede ayudar a determinar si el cáncer de próstata se propagó a los ganglios linfáticos adyacentes. Si el cáncer de próstata regresó después del tratamiento, la tomografía computarizada puede con frecuencia indicar si está creciendo en el interior de otros órganos o en las estructuras de la pelvis. Por otro lado, las tomografías computarizadas rara vez proporcionan información útil en los cánceres de próstata recientemente diagnosticados. Las tomografías computarizadas no son tan útiles como las imágenes por resonancia magnética (MRI) para observar la glándula prostática (ACS, 2012).

3.4.4 Resonancia magnética.

Los avances técnicos de la resonancia magnética (RM) en la última década hacen que se considere la técnica de elección en el manejo global del paciente con sospecha o diagnóstico de cáncer de próstata. La RM permite combinar información morfológica y funcional al mismo tiempo mediante la aplicación de secuencias como la espectroscopia, difusión y secuencias dinámicas con contraste endovenoso en el mismo estudio. La RM permite no solo focalizar el estudio en la glándula sino valorar también la extensión regional a toda la pelvis o a todo el cuerpo dependiendo de la indicación clínica, en menos de 1 hora de exploración. Las principales indicaciones clínicas de la RM de próstata son: a) estadificación local, regional o a distancia; b) detección o guía para biopsia diagnóstica ante la sospecha clínica o resultado negativo en biopsias previas; y c) monitorización terapéutica (*Villanova, et al. 2010*).

3.4.5 Gammagrafía ProstaScint.

Al igual que la gammagrafía ósea, la gammagrafía ProstaScint utiliza una inyección de material de baja radioactividad para detectar el cáncer que se propagó fuera de la próstata. Ambos exámenes buscan las áreas del cuerpo en las que se deposita el material radioactivo, pero funcionan de maneras diferentes (*Spectrum, Health, 2012*).

El material radioactivo de la gammagrafía ProstaScint es atraído por las células de la próstata en el cuerpo. Además, contiene un anticuerpo monoclonal, un tipo de proteína artificial que reconoce y se adhiere a una sustancia particular. En este caso, el anticuerpo se adhiere el antígeno de membrana prostático específico (PSMA), una sustancia que se encuentra en altas concentraciones en las células normales y cancerosas de la próstata (*Spectrum, Health, 2012*).

3.5 Biopsia de próstata.

3.5.1 Biopsia basal.

La necesidad de una biopsia de próstata ha de determinarse en función de la concentración de PSA, un DRE sospechoso o ambos. También debe tenerse en cuenta la edad biológica del paciente, las posibles enfermedades concomitantes (índice ASA e Índice de comorbilidad de Charlson) y las consecuencias terapéuticas (Turner, et al.2011). El primer valor elevado de PSA no debería conllevar una biopsia inmediata. El valor de PSA debe comprobarse al cabo de unas semanas con el mismo análisis en condiciones normalizadas (ACS, 2012).

Aunque se utiliza un abordaje transrectal en la mayoría de las biopsias de próstata, algunos urólogos prefieren emplear un acceso perineal. Las tasas de detección de cáncer en biopsias de próstata perineales son equivalentes a las obtenidas mediante biopsia transrectal (Villanova, et al. 2010).

El acceso perineal guiado por ecografía representa una alternativa útil en situaciones especiales, por ejemplo, después de una amputación rectal (Heidenreich, et al.2010).

3.6 Escala Gleason.

La escala de Gleason es el sistema más utilizado para evaluar el adenocarcinoma de próstata Solo puede evaluarse en material de biopsia (biopsia con trocar o piezas quirúrgicas) y no deben utilizarse preparaciones citológicas. La puntuación de Gleason es la suma de los dos patrones más frecuentes (grado 1-5) de crecimiento tumoral observados y oscila entre 2 y 10, siendo 2 el menos agresivo y 10 el más agresivo (Gleason, 1974). Así pues, la puntuación de Gleason es uno de los parámetros incorporados a nomogramas que predicen el riesgo de recidiva tras una prostatectomía. La puntuación de Gleason es la suma del grado de Gleason predominante y el segundo grado predominante (en cuanto a volumen). Cuando solo existe un grado, se duplica el grado primario (Heidenreich, 2010).

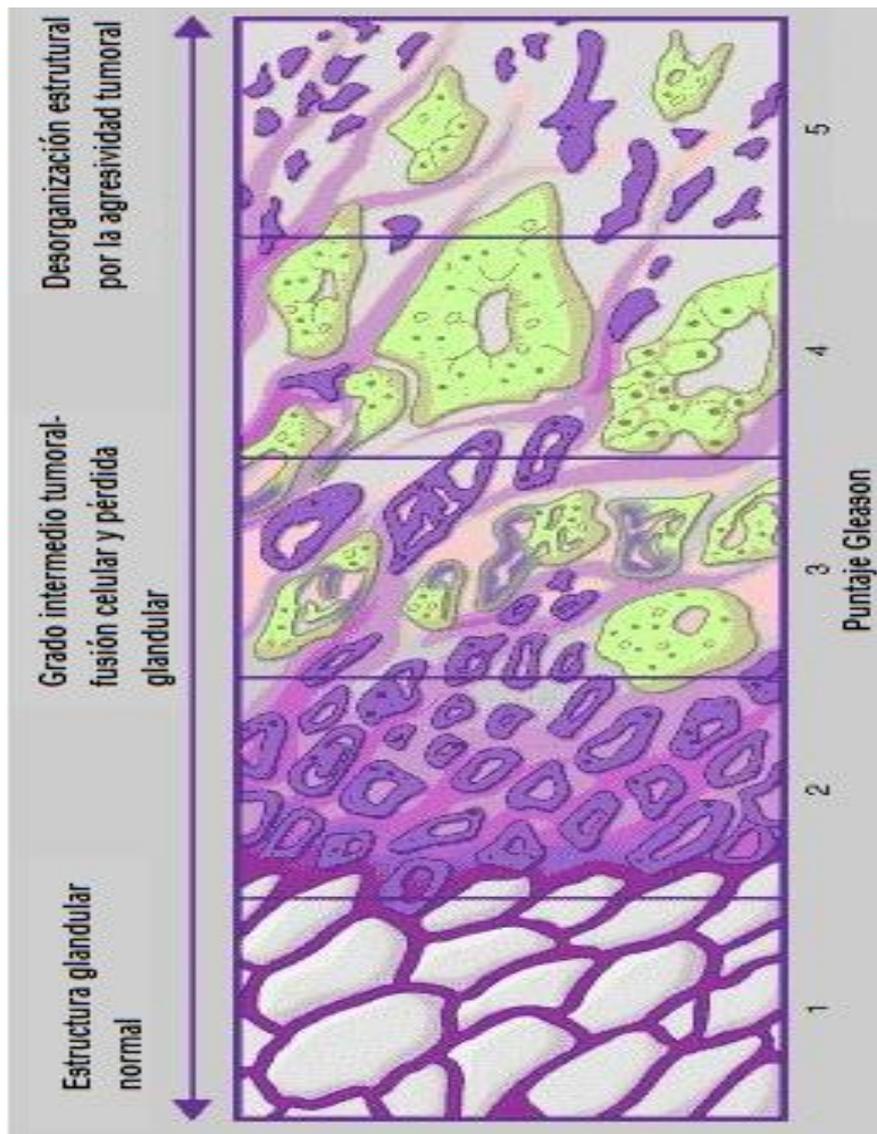


Figura 3. 2. Puntaje Gleason. (Modificado de Heindenreich, 2010).

Cuando un grado supone $\leq 5\%$ del volumen del cáncer, este grado no se incorpora a la puntuación de Gleason (regla del 5%). Tanto el grado primario como el secundario deben indicarse además de la puntuación de Gleason (por ejemplo, puntuación de Gleason de 7 [4 + 3]). Se ofrece una puntuación de Gleason global cuando existen varios tumores, aunque también debe mencionarse un foco tumoral separado con una mayor puntuación de Gleason. Un grado de Gleason terciario de 4 o 5, sobre todo cuando es superior al 5% del volumen del CaP, es un factor pronóstico desfavorable de recidiva bioquímica. También debe indicarse la

presencia de grado terciario y su proporción aproximada del volumen del cáncer, además de la puntuación de Gleason (Heidenreich, 2010).

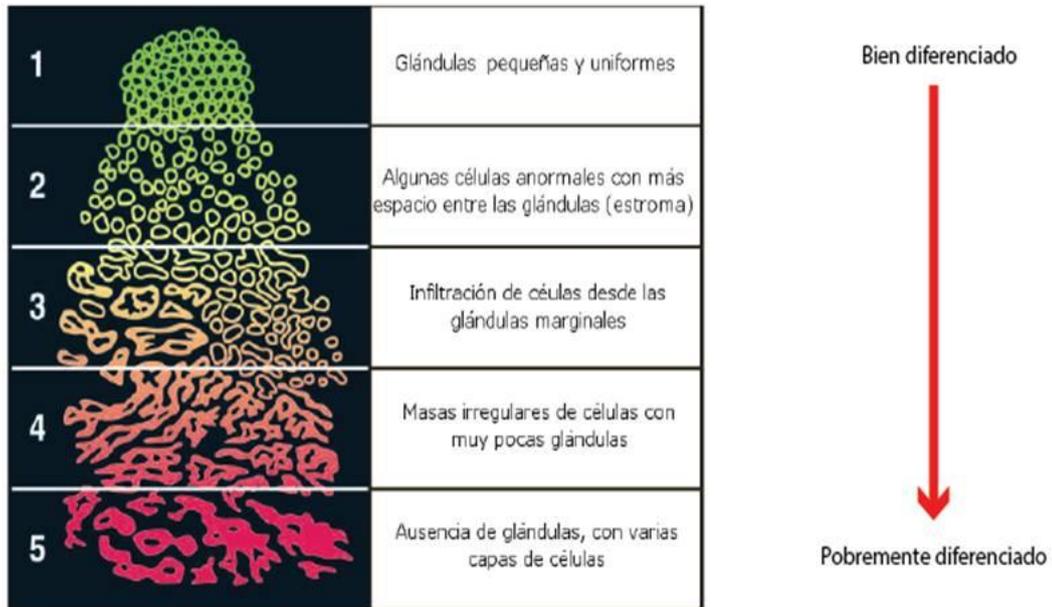


Figura 3 .3. Grados Histológicos Gleason. (Modificado de Heidenreich, 2010).

Los grados más pequeños tienen un crecimiento más lento, mientras que los grados más altos tienen un crecimiento muy acelerado o un aspecto menos común, dado que las células de la próstata varían mucho en su aspecto de una muestra a otra, el patólogo obtiene las dos puntuaciones más comunes de cada muestra y las suma para asignar una puntuación final. En función de la puntuación obtenida, existen 3 grados de Gleason: **G1.** Bien Diferenciado (Gleason 2-4). **G2.** Moderadamente Diferenciado (Gleason 5-6). **G3.** Probablemente Diferenciado (Gleason 7-10). (Modificado de Heidenreich, 2010)

CAPÍTULO IV TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS PROSTÁTICAS

4.1 Protocolo de Vigilancia Activa.

Debido a que el cáncer de próstata a menudo crece muy lentamente, puede que algunos hombres nunca necesiten tratamiento contra el cáncer de próstata. En su lugar, su médico puede que sugiera un enfoque conocido como espera en observación (también conocida como terapia expectante) o vigilancia activa (ACS, 2012).

La vigilancia activa a menudo se usa para vigilar con atención el cáncer mediante pruebas de PSA, exámenes digitales del recto y ultrasonidos a intervalos regulares para saber si el cáncer está creciendo. Se pueden hacer también biopsias de la próstata para saber si el cáncer ha comenzado a crecer rápidamente (INC, 2011).

Puede ser una buena opción si el cáncer no está causando síntomas, está lentamente creciendo, y que sea pequeño y esté confinado en la próstata (ACS, 2012).

4.2 Terapia Hormonal.

El objetivo de la terapia hormonal es reducir los niveles de las hormonas masculinas (andrógenos), como la testosterona, o evitar que alcancen las células cancerosas de la próstata. Los andrógenos, que se producen mayormente en los testículos, hacen que las células cancerosas crezcan. La reducción de los niveles de andrógenos evita que las células del cancerígenas de la próstata crezcan lentamente por un tiempo. Sin embargo, la terapia hormonal sola puede controlar, pero no curar el cáncer. Tampoco sustituye a los tratamientos dirigidos a curar el cáncer (Antonarakis y Eirsenberg, 2011).

4.3 Cirugía.

El tratamiento quirúrgico del CaP consiste en una prostatectomía radical (PR), que supone la extirpación de toda la próstata entre la uretra y la vejiga, así como la resección de ambas vesículas seminales junto con tejido adyacente suficiente para obtener un borde negativo. A menudo, este procedimiento se acompaña de una linfadenectomía pélvica bilateral. En varones con CaP localizado y una esperanza de vida ≥ 10 años, el objetivo de una PR es la erradicación de la enfermedad, al tiempo que se mantiene la continencia y, siempre que sea posible, la potencia sexual. No existe un umbral de edad para la PR y no debe descartarse este procedimiento basándose únicamente en la edad. Por el contrario, una comorbilidad cada vez mayor aumenta considerablemente el riesgo de fallecer por causas no relacionadas con el CaP (*Heidenreich, 2010*).

4.4 Radioterapia.

La radioterapia es un tratamiento que usa rayos de alta energía (como los rayos X) para eliminar las células cancerosas o encoger los tumores. Se puede usar:

- Como tratamiento inicial para tratar el cáncer de bajo grado que aún está confinado en la glándula prostática.
- Como parte del tratamiento inicial (junto con terapia hormonal) para cánceres que han crecido fuera de la próstata y hacia tejidos cercanos.
- Si el cáncer no se extirpó por completo o regresa (recurre) en el área de la próstata después de la cirugía.
- Si el cáncer es avanzado, para reducir el tamaño del tumor y proporcionar alivio a posibles síntomas presentes y futuros.

La radiación puede provenir de fuera del cuerpo (radiación externa) o de materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (braquiterapia o radiación interna) (*Wilt, et al. 2008*).

4.5 Vacunas.

Sipuleucel-T (Provenge®) es una vacuna contra el cáncer usada para tratar el cáncer de próstata avanzado. Contrario a la mayoría de las vacunas, ésta tiene la finalidad de tratar el cáncer de próstata, no prevenirlo. La vacuna se produce específicamente para cada hombre que la recibe. No se produce en grandes cantidades (ACS, 2012).

Los efectos secundarios de la vacuna suelen ser más leves que los de la terapia hormonal o la quimioterapia. Los efectos secundarios a corto plazo pueden incluir fiebre, escalofríos, cansancio, dolor de espalda y de articulaciones, náuseas y dolores de cabeza (ACS, 2012).

Se continúan realizando estudios para determinar si esta vacuna puede ayudar a los hombres que tienen cáncer de próstata menos avanzado (ACS, 2012).

| ETAPAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA | | |
|--|---|--|
| LOCALIZADO | | TRATAMIENTO |
| Stage T1  | El Cáncer de Próstata en esta etapa no se siente y no causa ningún síntoma. El cáncer se encuentra solamente en la próstata y se detecta durante un chequeo médico urinario. | Cirugía Radical Braquiterapia de Próstata |
| Stage T2  | Las células cancerosas se encuentran en la glándula prostática únicamente. El tumor puede detectarse por medio de una biopsia por aguja o por simple tacto rectal. | Radioterapia Externa Dinámica Conformada Ultrasonido Focalizado de Alta Frecuencia (HiFU) |
| AVANZADO | | |
| Stage T3  | Las células cancerosas se han diseminado fuera del recubrimiento (cápsula) de la próstata a los tejidos circundantes. | Radioterapia Externa |
| Stage T4  | Diseminación (por metastasis) a los ganglios linfáticos (cerca o lejos de la próstata) o a los órganos y tejidos situados lejos de la próstata -los huesos, hígado o los pulmones-. | Hormonoterapia |

Figura 4 .1. Tratamiento según las etapas del Cáncer de Próstata. (ACS, 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar las mutaciones y polimorfismos del DNA mitocondrial (mtDNA) en pacientes mexicanos con cáncer de próstata (CaP); mediante el empleo de técnicas moleculares, PCR punto final y secuenciación biparalela; a fin de identificar marcadores mitocondriales implicados en dicha patología constituyendo así una excelente herramienta de diagnóstico molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

Extraer el DNA genómico mediante la técnica Silica-based Method-Dneasy Tissue Kits™ a partir de tejido prostático benigno y maligno, empleados como control negativo y positivo, respectivamente; para amplificar el genoma mitocondrial con la técnica Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR) punto final y purificar los fragmentos obtenidos con el método de purificación en columna- QIAquick PCR Purification®.

Realizar una secuenciación biparalela de los productos purificados de PCR y con ello identificar las mutaciones y polimorfismos involucrados con la enfermedad para comparar los tejidos, enfermo y sano, procedentes de biopsias transrectales y prostatectomía radical para así analizar el comportamiento del cáncer de próstata en el ADN mitocondrial (mtDNA).

Investigar la filogenética de las mutaciones y polimorfismos del DNA mitocondrial (mtDNA) en pacientes mexicanos con cáncer de próstata (CaP) mediante el análisis con la herramienta bioinformática, Mitomap™, para establecer una relación entre los haplogrupos-haplotipos involucrados y su probable asociación con el cáncer de próstata (CaP).

CASOS CLÍNICOS

Se analizaron tres muestras de diferentes pacientes, uno con un historial completo clínico y otras dos sin historial clínico, A continuación, se describen los casos clínicos estudiados.

Se estudió la muestra (C+, Tejido neoplásico; C-, Tejido Sano) de un paciente de 69 años de edad y abogado de profesión. Acude por primera vez al especialista en Urología y Urodinamia, Dr. Sergio E. Ureta Sánchez, en el Hospital Español, por presentar hematuria (sangre en la orina) macroscópica. De primera intención se atribuyó a la posibilidad de efecto anticoagulante, sin embargo al hacer la exploración se constató que el paciente tenía una próstata muy indurada y crecida que sugería la posibilidad de neoplasia (Cáncer) de próstata. Al paciente se le sugirió hacer estudios de confirmación sin embargo, no fue hasta el día 6 de diciembre de 2012 en que nuevamente se presentó a la consulta (6 meses después) y se pudo ratificar la impresión clínica previa, por lo que se le sometió a BIOPSIA PROSTÁTICA Y ENDOSCOPIA CON RESECCIÓN TRANSURETRAL DE PRÓSTATA, hasta el día 28 de mayo de 2013 en donde se pudo apreciar un resultado histopatológico de un adenocarcinoma poco diferenciado grado 4 +4 de Gleason en el 90% del material estudiado. Con este diagnóstico se le envió a practicar estudios de extensión con tomografía axial computarizada más rastreo óseo gamagráfico, en donde se aprecia francamente metástasis ganglionares y óseas motivo por lo que fue necesario la propuesta de tratamiento paliativo con bloqueo androgénico completo a base de análogos agonistas LH-RH y anti andrógenos tipo calutamida. El paciente actualmente se encuentra bajo este tratamiento y esperamos a que el Antígeno Prostático Específico por arriba de 20 (21.4 ng/ml) inicie su descenso de ser el problema neoplásico hormono dependiente.

De igual manera se estudiaron otras dos muestras de diferentes pacientes, (BT: Biopsia Trasrectal; PR: Prostatectomía Radical, en estas muestras sólo se secuenció bidireccionalmente la región MT-ND5). Desafortunadamente no se cuenta con el historial clínico de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Fundamentos Básicos.

5.1.1 Métodos para localizar polimorfismos o mutaciones.

El análisis de la estructura del DNA y su papel en la expresión génica se han visto enormemente facilitados por el desarrollo de poderosas técnicas como la PCR y secuenciación de las moléculas de DNA. Mediante dichas técnicas se ha investigado la existencia de diversidad genética en una población conocida como polimorfismo, así como las alteraciones o mutaciones en las mismas. La mutación detectada puede ser por sí misma causa de enfermedad, o puede estar directamente ligada a otra que sí lo sea (*Berg et al., 2003*).

5.1.2 Extracción de DNA genómico.

En esta investigación la extracción de DNA genómico fue realizada por medio de un kit comercial, QIAamp DNA Mini Blood and Tissue®, el cual se fundamenta en la *cromatografía de adsorción*, según la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del DNA en soluciones acuosas. Con la adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana. Con esta tecnología, no se produce ningún efecto sobre las moléculas de los ácidos nucleicos ya que la unión intramolecular de los mismos no es

de naturaleza hidrofóbica. Con este rápido proceso de purificación mediante la tecnología de la adsorción-desorción sobre membranas de sílica, se obtiene ácidos nucleicos altamente purificados y listos para usar en procesos posteriores como PCR, RT-PCR, QPCR, secuenciación, blotting, clonaje, etc (*Quiagen, 2006*).

5.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

En 1983, Kary Mullis conceptualizó una nueva técnica para amplificar DNA en un tubo de ensayo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar fragmentos de DNA un billón de veces en pocas horas además de que pueden utilizarse cantidades extremadamente pequeñas del DNA original. La base de la PCR es la replicación catalizada por una DNA polimerasa la cual requiere de dos elementos esenciales: una cadena simple de DNA molde del cual una nueva cadena de DNA puede ser copiada y un primer con un grupo 3'-OH al cual nuevos nucleótidos pueden ser añadidos. Ya que una molécula de DNA consiste de dos cadenas de nucleótido y cada una sirve como molde para producir una nueva molécula de DNA, la cantidad de DNA se duplica con cada evento de replicación. El punto de inicio de la síntesis en el templado es determinado por la elección de los cebadores (primers) que son fragmentos cortos de DNA de entre 17-20 nucleótidos y son complementarios a la secuencia conocida en el templado, cada primer es diferente para cada cadena (*Pierce, 2006*). La PCR se lleva a cabo en una solución que contiene la secuencia diana, un par de cebadores que hibridan con las secuencias diana, cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), una polimerasa estable al calor y iones de magnesio y otras sales que son necesarias para la reacción (*Berg et al., 2003*).

Un ciclo de PCR (Figura 5.1) consiste en tres etapas: en la primera (desnaturalización), la solución es calentada a una temperatura entre 90° y 100°C para romper los enlaces de hidrógeno entre las dos cadenas de nucleótidos y así tener los templados de cadena sencilla. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura por solo un minuto o dos. En la segunda etapa la solución de DNA es enfriada rápidamente a una temperatura entre 50° y 65°C durante un minuto o menos. Durante este intervalo corto las cadenas de DNA no tendrán oportunidad de realinearse ya que los primers estarán disponibles para reconocer a su secuencia complementaria en las cadenas originales. En la etapa 3, la solución es calentada entre 60° y 70°C, temperatura a la cual la DNA polimerasa puede sintetizar nuevas cadenas de DNA mediante la adición de nucleótidos a los primers. El ciclo completo se repite y en cada ciclo la cantidad de DNA se duplica. Una molécula de

DNA se incrementa más de 1000 moléculas en 10 ciclos de PCR (Berg et al., 2003). La DNA polimerasa fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en los manantiales hirvientes del Parque Nacional de Yellowstone. Esta enzima (*Taq polimerasa*) es muy estable a altas temperaturas y no se desnaturaliza durante la etapa de separación de las cadenas de la PCR, y por lo tanto puede adicionarse a la mezcla de reacción al inicio del proceso de PCR y continua funcionando a lo largo de muchos ciclos (Pierce BA, 2006).

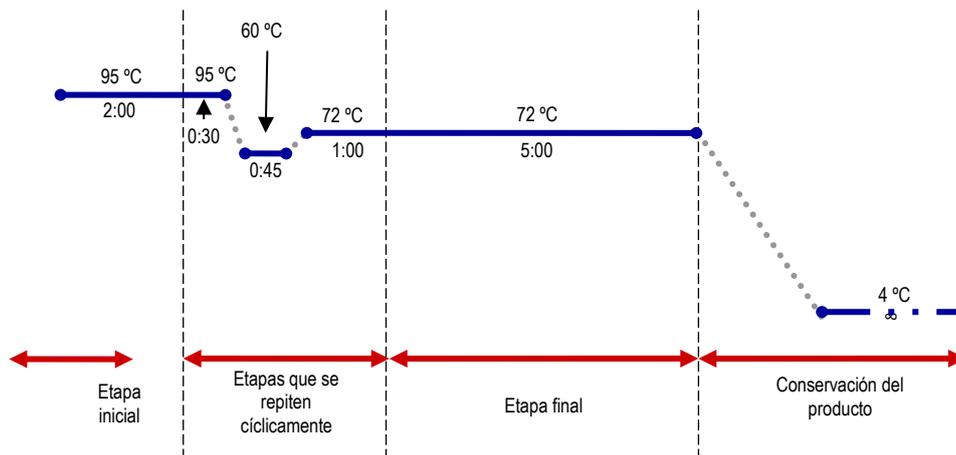


Figura 5. 1. Diagrama tiempo-temperatura en un programa de PCR.

Para visualizar los productos de la PCR se hace una electroforesis en gel de agarosa utilizando además bromuro de etidio que es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción del DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Van der Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente. El colorante o buffer de carga del gel que se mezcla con las muestras antes de cargarlas tiene 3 propósitos: 1) incrementar la densidad de la muestra, 2) asegurar que el DNA descienda uniformemente dentro del pocillo y 3) añadir color a la muestra, con lo que se simplifica el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico.

5.1.3 Secuenciación.

La secuenciación del DNA se basa en la generación de fragmentos cuya longitud depende de la última base de la secuencia. Se pueden generar grupos de estos fragmentos por interrupción controlada de la replicación enzimática (método desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores). Esta técnica se lleva a cabo en cuatro mezclas de reacción al mismo tiempo, en las cuales una DNA polimerasa sintetiza la hebra complementaria de una secuencia concreta de una molécula de DNA de hebra simple. El cebador para la síntesis es un fragmento complementario de una parte de la secuencia conocida. Cada mezcla de reacción contiene, además de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (marcados radiactivamente), una pequeña cantidad del análogo 2',3'-dideoxi de uno de los nucleótidos, uno diferente para cada mezcla de reacción. La incorporación de este análogo impide todo crecimiento posterior de la nueva cadena, porque carece del grupo hidroxilo en 3', que es esencial para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. La concentración de este análogo dideoxi es lo suficientemente pequeña para que sólo ocasionalmente se produzca la terminación de la cadena. La polimerasa añadirá a veces el nucleótido correcto y otras veces el análogo dideoxi, deteniéndose la reacción. Así por ejemplo, si está presente el análogo dideoxi del dATP, se producen fragmentos de distinta longitud pero todos terminarán con el análogo dideoxi de ese nucleótido, el cual sólo se insertará donde se localice una T en el DNA que se está secuenciando. Por tanto, los fragmentos de diferente longitud corresponderán a las posiciones de T. Cuatro de estas series de fragmentos de cadena interrumpida (una por cada análogo dideoxi) se separan por electroforesis y la secuencia de bases del nuevo DNA se lee a partir del autorradiograma de las cuatro calles (*Berg et al., 2003*). Hoy en día, la secuenciación es realizada por máquinas automatizadas que utilizan colorantes fluorescentes y lectores laser para secuenciar millones de pares de bases en pocas horas. La reacción dideoxi también se utiliza, pero los ddNTPs utilizados en la reacción son marcados con un colorante fluorescente diferente para cada dideoxinucleotido. Por ejemplo, un colorante rojo puede ser utilizado para nucleótidos con timina, un verde para aquellos con adenina, un negro para los que tienen guanina y un azul para citosina. En este caso, las cuatro reacciones de secuenciación pueden hacerse en el mismo tubo y se pueden correr en el mismo pozo durante la electroforesis dado que cada ddNTP es marcado de manera distinta. Las máquinas de secuenciación más recientemente desarrolladas llevan a cabo la electroforesis en tubos capilares que contienen gel. Los tamaños de fragmentos producidos por la reacción de secuenciación se separan dentro del tubo y pasan a través

de un rayo láser y detector. Al paso de los fragmentos por el láser, sus colorantes fluorescentes se activan y resulta la fluorescencia detectada por un lector óptico. Cada colorante emite fluorescencia de una longitud de onda característica, la cual es leída por el lector óptico. La información pasa a una computadora para ser interpretada y los resultados se imprimen como un conjunto de picos en una gráfica (electroferograma). Las máquinas secuenciadoras automatizadas pueden tener 96 o más tubos capilares permitiendo de 50,000 a 60,000 pb de secuencia sean leídas en pocas horas (*Pierce BA, 2006*). Esta parte de la investigación se realizó en las instalaciones del Instituto de Fisiología (UNAM) en la Unidad de Biología Molecular.

5.2 Ejecución Experimental.

5.2.1 Extracción de DNA genómico a partir de Tejido Prostático

Esta parte de la experimentación se realizó en la Unidad de Investigaciones Multidisciplinarias (UIM.FESC.UNAM). El tejido prostático se encontraba en condiciones óptimas ya que, tras la biopsia transrectal y/o prostactetomía radical, las muestras se resguardaron a -27°C en solución fisiológica en un congelador especializado tipo Revco™, para la posterior extracción de DNA genómico con la utilización de un kit comercial, QIAamp DNA Mini Blood and Tissue®. A continuación, se describe el material empleado y la metodología efectuada.

Material

- 2 tubos Eppendorf® de 1.5 ml.
- Columna QIAamp Spin® con tubo colector.
- Termomixer® a 56°C, vortex y micropipetas.
- Microcentrífuga con capacidad para 14000 rpm.
- Kit de soluciones de QIAamp DNA Mini Blood and Tissue® (Proteinasa K, buffer AL, etanol absoluto, buffer AW1, buffer AW2 y buffer AE).

Metodología

1. Cortar 25 mg de tejido en partes pequeñas y colocarlas en un tubo de 1.5 ml y adicionar 180 μ l de buffer ATL.
2. Adicionar 20 μ l de proteinasa K, mezclar con vortex e incubar a 56°C hasta que el tejido se haya lisado completamente. Mezclar con vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra.
3. Mezclar con vortex 15 segundos y adicionar 200 μ l de buffer AL a la muestra y mezclar. Adicionar 200 μ l de etanol (96-100%) y mezclar nuevamente.
4. Pasar la mezcla (incluyendo el precipitado) a una columna DNeasy mini spin contenida en un tubo de 2 ml y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
5. Descartar el tubo con el filtrado, colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y adicionar 500 μ l de buffer AW1.
6. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el tubo con el filtrado.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y adicionar 500 μ l de buffer AW2.
8. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para lavar la membrana de la columna. Descartar el tubo con el filtrado.
9. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 200 μ l de buffer AE directamente en la membrana e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
10. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm para eluir el DNA.
11. Resguardar el DNA a -27 °C para su posterior utilización.

5.2.2 Cuantificación y pureza del DNA.

Para confirmar de la presencia de DNA, se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro UV, NanoDrop ND-1000®, en los límites del espectro de absorción de 200 a 350 nm de los ácidos nucleicos.

Material

- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000®
- Micropipeta de 0.5 – 10 µl.
- Agua libre de nucleasas.
- Muestra de DNA de tejido prostático.

Metodología

1. Conectar el Nanodrop ND1000® e iniciar el programa en la computadora para cuantificación de ácidos nucleicos.
2. Levantar el brazo del espectrofotómetro y colocar 2 µl de H₂O libre de nucleasas y RNAasas y presionar “enter” para iniciar el equipo.
3. Limpiar con papel absorbente la gota de agua y colocar 2 µl de la solución blanco (en este caso H₂O nuevamente) y presionar “leer blanco”.
4. Limpiar con papel absorbente la gota del blanco y colocar 2 µl de la muestra problema y presionar “F1”.

Nota: en cada lectura se debe observar la burbuja que se forma por tensión superficial, entre el brazo del espectro y la base donde se coloca la gota de la solución a leer.

5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Amplificación del genoma mitocondrial completo (mtDNA).

En esta parte se amplificó el genoma mitocondrial completo en 24 fragmentos de 600-900 pares de bases aproximadamente. Se utilizaron los primers ya existentes el laboratorio 8 de la UIM-FESC (Ver en anexos), los cuales se diseñaron estratégicamente para cubrir el total del genoma mitocondrial sin embargo, no correspondió a esta investigación el diseño de los mismos.

Material

- Tubos de 200 μ l.
- Micropipetas.
- Solución Master Mix de Promega® (*Taq* polimerasa, DNTP's, MgCl₂, Buffer).
- Agua libre de nucleasas y DNA problema.
- Termociclador.

Metodología

Preparar tubos de reacción acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5 .1. Preparación de una PCR para un volumen de reacción de 100 μ l

| REACTIVO | VOLUMEN |
|-------------------------|---|
| PCR Master mix (kit) | 50 μ l |
| Primer R | 8 μ l |
| Primer F | 8 μ l |
| DNA | 2 μ l |
| Agua libre de nucleasas | La necesaria para completar 100 μ l |

También se prepara un tubo blanco (control negativo) con agua en lugar de DNA. Los tubos preparados se agitan perfectamente para homogenizar la solución y se colocan dentro del termociclador previamente programado a: 95°C 2' (precalentamiento); 95°C 30" (desnaturalización), 60 °C 45" (alineamiento), 72 °C 1' (elongación) [35 ciclos]; 72 °C 5'; 4 °C ∞ .

5.2.4 Electroforesis en geles de agarosa.

Para la visualización de la amplificación de los fragmentos del mtDNA se recurrió a la electroforesis en geles de agarosa, los cuales fueron preparados al 0.7 %.

Material

- Matraz erlenmeyer 125 ml y probeta de 100 ml.
- Balanza analítica y horno de microondas.
- Parafilm, Micropipetas y vórtex.
- Cámara horizontal de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Agarosa y buffer TAE 1x.
- Bromuro de etidio.
- Marcador molecular 1 kb Promega ®.
- Fragmento de mtDNA amplificado (producto de PCR)

Metodología

Preparación del gel de agarosa al 0.7%

1. Cerrar las aperturas laterales del soporte del gel.
2. En un matraz Erlenmeyer pesar 0.35g de agarosa y adicionar 50 ml de TAE 1X.
3. La mezcla es calentada en horno de microondas a potencia baja, hasta que se disuelva completamente.
4. Añadir una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5µg/µL) y mezclar bien.
5. La mezcla se vierte en el soporte evitando la formación de burbujas, si se forman es preciso removerlas. Colocar los peines antes de verter la mezcla.
6. Dejar solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
7. Retirar los peines y colocar el gel en la cámara de electroforesis de modo que los pocillos queden cercanos al cátodo de la cámara; por último se adiciona TAE 1X a la cámara hasta que el gel se encuentre completamente sumergido.

Carga y corrida del gel

En un trozo de parafilm situar 3 μ l de

1. μ l de colorante (buffer de carga azul/naranja 6X) correspondiente al número de muestras, blanco y marcador de peso molecular.
2. Posteriormente añadir 3 μ l de BrEt diluido (0.01 μ g/ml) a un lado de las gotas de colorante sin que se mezclen.
3. Finalmente colocar 5 μ l de muestra, o blanco, o marcador de peso molecular. Mezclar una a una con los otros componentes, recoger la mezcla utilizando una micropipeta y depositar cuidadosamente en el pocillo correspondiente.
4. Cuando se ha terminado de cargar el gel, se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder (~90V). El cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos, de modo que la molécula de DNA migre hacia el ánodo.
5. La corrida dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario del gel.
6. Para visualizar el DNA se utiliza un fotodocumentador.

5.2.2 Purificación de los Fragmentos de PCR.

Las muestras fueron purificadas mediante el uso de un kit comercial, QIAquick PCR Purification ®, con el fin de eliminar el ruido de fondo y los terminadores sobrantes para la obtención de resultados satisfactorios. Los primers utilizados para la reacción de secuenciación fueron los mismos para la amplificación de los fragmentos del mtDNA. Cabe destacar que se realizó de manera bidireccional para minimizar al máximo los errores de lectura del secuenciador.

Material

Con kit QIAquick PCR Purification ®

- Producto de PCR.
- Tubo eppendorf ® de 1.5 ml.
- Columna QIAquick® con tubo colector.
- Vórtex y micropipetas.
- Microcentrífuga con capacidad para 13000 rpm.
- Kit de soluciones de QIAquick PCR Purification® (buffer PBI, buffer PE, buffer EB).

Metodología

1. Adicionar 5 volúmenes del buffer PBI por 1 volumen del producto de PCR y mezclar.
2. Comprobar que el color de la mezcla es amarillo.
3. Pasar la mezcla a una columna QIAquick spin contenida en un tubo colector de 2 ml.
4. Descartar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Para lavar, adicionar 0.75 ml de buffer PE en la columna y centrifugar de 30 a 60 segundos.
6. Descartar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo. Centrifugar la columna por 1 minuto más.
7. Pasar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml.
8. Para eluir el DNA, adicionar 50 ml del buffer EB o agua en el centro de la membrana de la columna y centrifugar por 1 minuto.
9. Para analizar el DNA purificado en un gel, adicionar 1 volumen de loading dye por 5 volúmenes del purificado. Mezclar la solución por pipeteo antes de correr el gel

RESULTADOS

Resultados obtenidos del análisis de mutaciones y polimorfismos del mtDNA en pacientes mexicanos con cáncer de próstata.

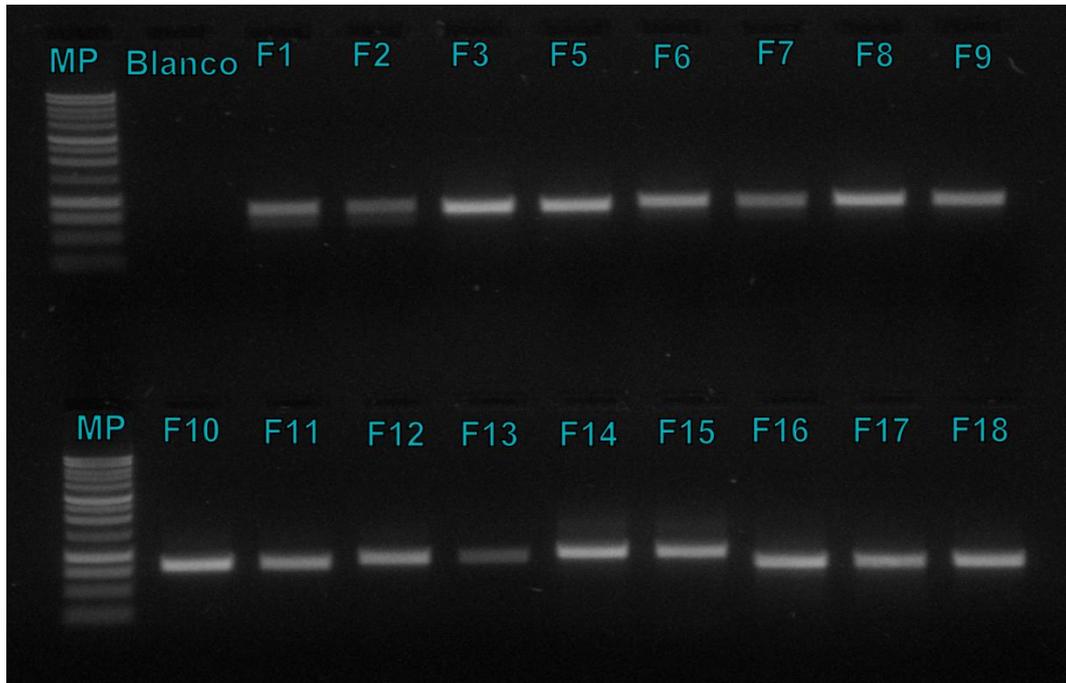


Figura R.1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %. Se muestran los amplificados de 650-700 bp del mtDNA de los fragmentos (F) F1- F18, de las muestras C+; C-.

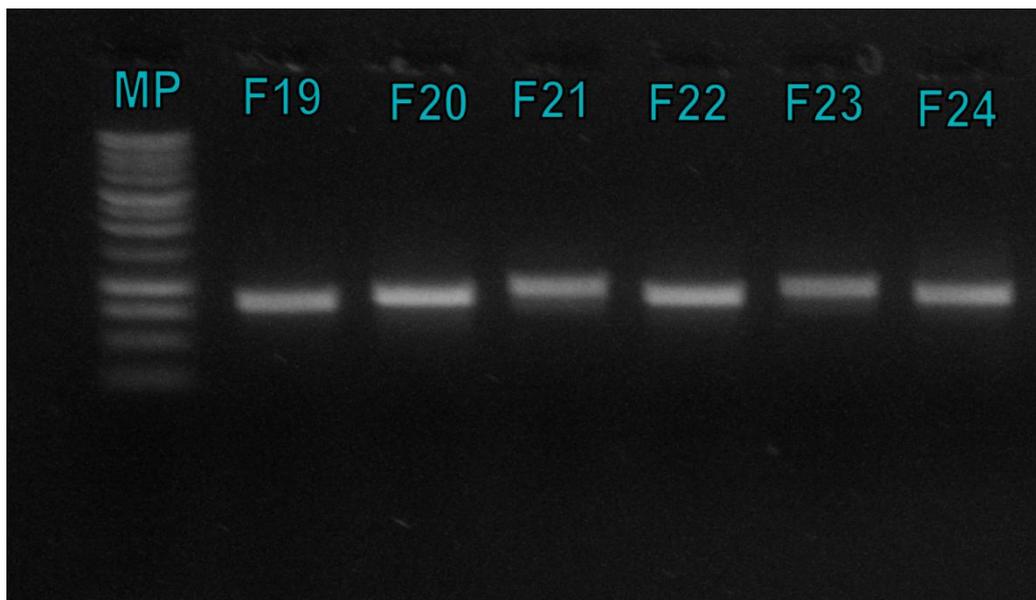


Figura R.2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %. Se muestran los amplificados de 650-700 bp del mtDNA de los fragmentos (F) F19- F24, de las muestras C+; C

Análisis de las mutaciones y polimorfismos estudiados, se indica la posición (P), el locus (L), el nucleótido cambiado (NC), el número de codón (Ncod), la posición de codón (PCod), el cambio de aminoácido (Ca), la frecuencia GB frecuencia (GBF) y la enfermedad asociada - marcador de haplogrupo (EyMH).

Tabla R. 1. Mutaciones y Polimorfismos Experimentales C+; C-.

| P | L | NC | Ncod | PCod | Ca | GBF | EyMH | Referencias |
|--------|------------------------|-------|------|------|--------------|-------|---|---|
| 489 | MT-DLOOP | T-C | | | | | Cáncer de Próstata Homoplásmica (+) | https://www.mitomap.org/bin/view.pl/Main/SearchAllele |
| 663 | MT-RNR1 | A-G | - | - | 12S rRNA | 681 | Riesgo de arteroesclerosis coronaria/ N-non R subgrupo: Haplogrupo N subgrupo A | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 750 | MT-RNR1 | A-G | - | - | rRNA rCRS | 23808 | H2a | Van Oven, 2010 |
| 1,438 | MT-RNR1 | A-G | - | - | rRNA | 22761 | Haplogrupo H | Van Oven, 2010 |
| 1,736 | MT-RNR2 | A-G | - | - | rRNA | 680 | Haplogrupo A | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 2,706 | MT-RNR2 | A-G | - | - | rRNA | - | Haplogrupo LO, D4b, F1 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 3,107 | MT-RNR2 | C-del | - | - | rRNA | - | Haplogrupo H2a2a1 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 4,248 | MT-ND1 | T-C | 314 | 3 | syn:I-I | - | Haplogrupo D4a | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 4,824 | MT-ND2 | A-G | 119 | 1 | non syn:T-A | - | Haplogrupo L1, D, N9, A | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 6,261 | MT-CO1 | G-A | 120 | 1 | non-syn:A-T | - | G6261A Homoplásmica (+) Asociada a Cáncer de Próstata | http://www.mitomap.org/bin/view.pl/Main/SearchAllele Petros, J. A., Baumann, A. K., Ruiz-Pesini, E., Amin, M. B., Sun, C. Q., Hall, J., Lim, S., Issa, M. M., Flanders, W. D., Hosseini, S. H., Marshall, F. F., Wallace, D. C. (2005) <i>mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer</i> Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America . 102 (3): 719-724 |
| 7,028 | MT-CO1 | C-T | 375 | 3 | syn:A-A | - | Haplogrupo Q3 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 8,027 | MT-CO1 | G-A | 148 | 1 | non-syn:A-T | - | Haplogrupo L0, L1, A2, R31 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 8,794 | MT-ATP6 | C-T | 90 | 1 | H-Y | - | C8794T Homoplásmica (+) Intolerancia al ejercicio y riesgo de arterioesclerosis coronaria | http://www.mitomap.org/bin/view.pl/Main/SearchAllele Sawabe, M., Tanaka, M., Chida, K., Arai, T., Nishigaki, Y., Fuku, N., Mieno, M. N., Kuchiba, A., Tanaka, N. (2011) <i>Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients</i> Journal of Athero |
| 8,862 | MT-ATP6 | A-G | 112 | 3 | syn: T-T | - | A8862G Epilepsia | http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 9,136 | MT-ATP6 | A-G | 204 | 1 | non-syn: I-V | 87 | Haplogrupo L0 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers |
| 9,300 | MT-CO3 | G-A | 32 | 1 | non-syn:A-T | 91 | Haplogrupo L0/Miopatía | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 12,007 | MT-ND4 | G-A | 416 | 3 | syn:W-W | 1576 | Cáncer Oral Haplogrupo L2a | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 12,009 | MT-ND4 | G-A | 417 | | | | Mutación no descrita | http://bioinformatics.css-mendel.it/index.php/tools/2014-01-10-22-56-33/web-service |
| 12,705 | MT-ND5 | C-T | 123 | 3 | syn:I-I | - | Cáncer de Próstata Homoplásmica (+) C12705 Haplogrupo R | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 14,766 | MIT-CYB | C-T | 7 | 2 | non-syn:T-I | 17446 | Haplogrupo L0, M2, I2 | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 15,172 | MT-CYB | G-A | 142 | 3 | syn:G-G | 105 | Haplogrupo M1, M5, M10, D. | http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupMarkers http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/VariantSubmissionList |
| 16,223 | MT-DLOOP | C-T | - | - | - | - | Tumor | https://www.mitomap.org/bin/view.pl/Main/SearchAllele |

Acotaciones

P= Posición; L= Locus; NC= Nucleótido cambiado; Ncod= Número de codón; PCod= Posición de codón; Ca=Cambio de aminoácido; GBF= GB frecuencia; EyMH= Enfermedad asociada y Marcador de haplogrupo;

Polimorfismos asociados a haplogrupos.

Polimorfismos asociados a haplogrupos y a otras patologías.

Mutaciones asociadas al Cáncer de Próstata.

Comparación de la secuencias de los electroferogramas de la muestra C+; C- en donde se muestran las mutaciones detectadas con su probable asociadas al cáncer de próstata (CaP).

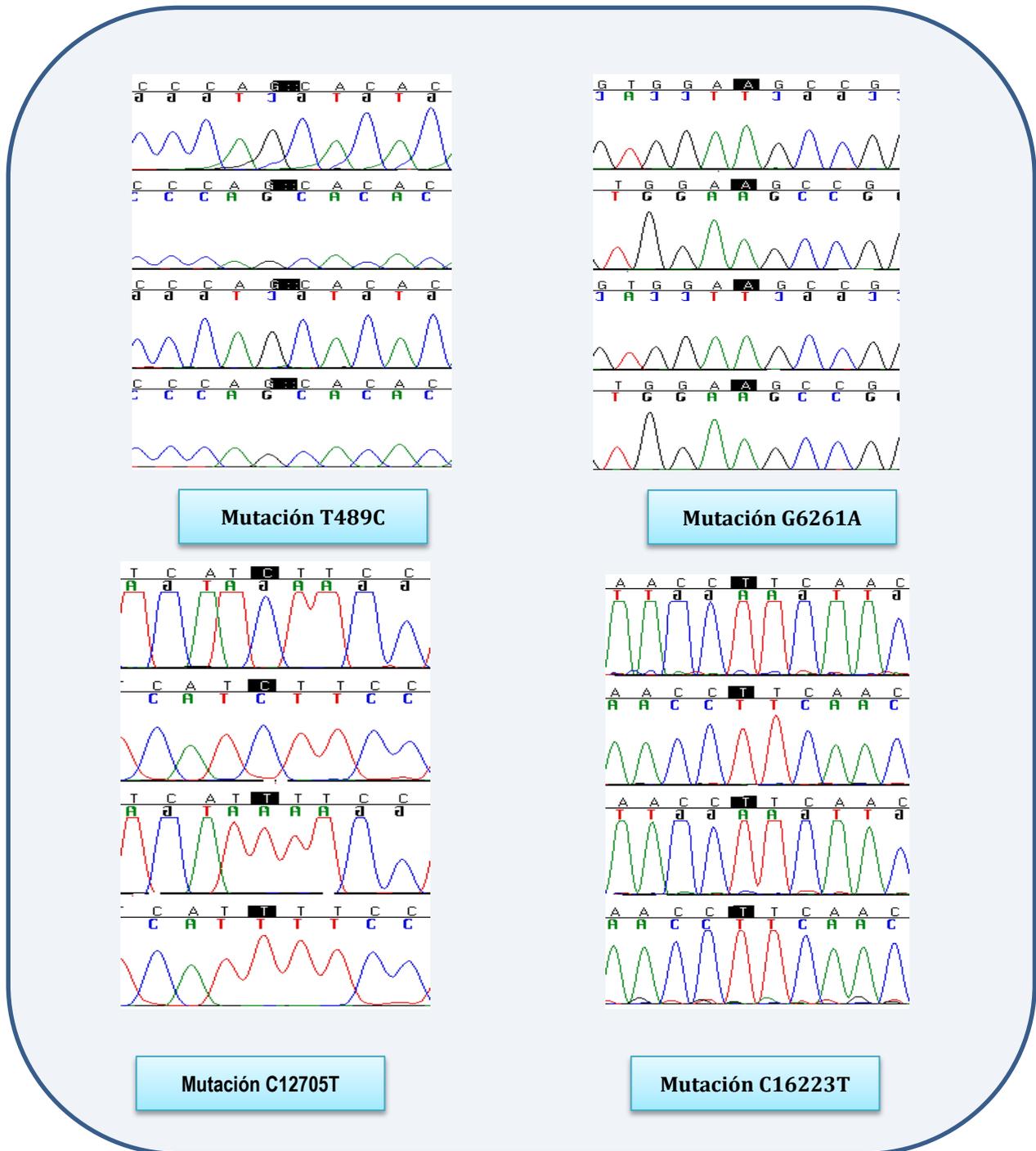


Figura R. 3. Mutaciones localizadas experimentalmente asociadas al Cáncer de Próstata en la muestra C+;C-.

Muestra de las regiones del mtDNA con las mutaciones localizadas experimentalmente asociadas al cáncer de próstata (CaP) y otras patologías detectadas.

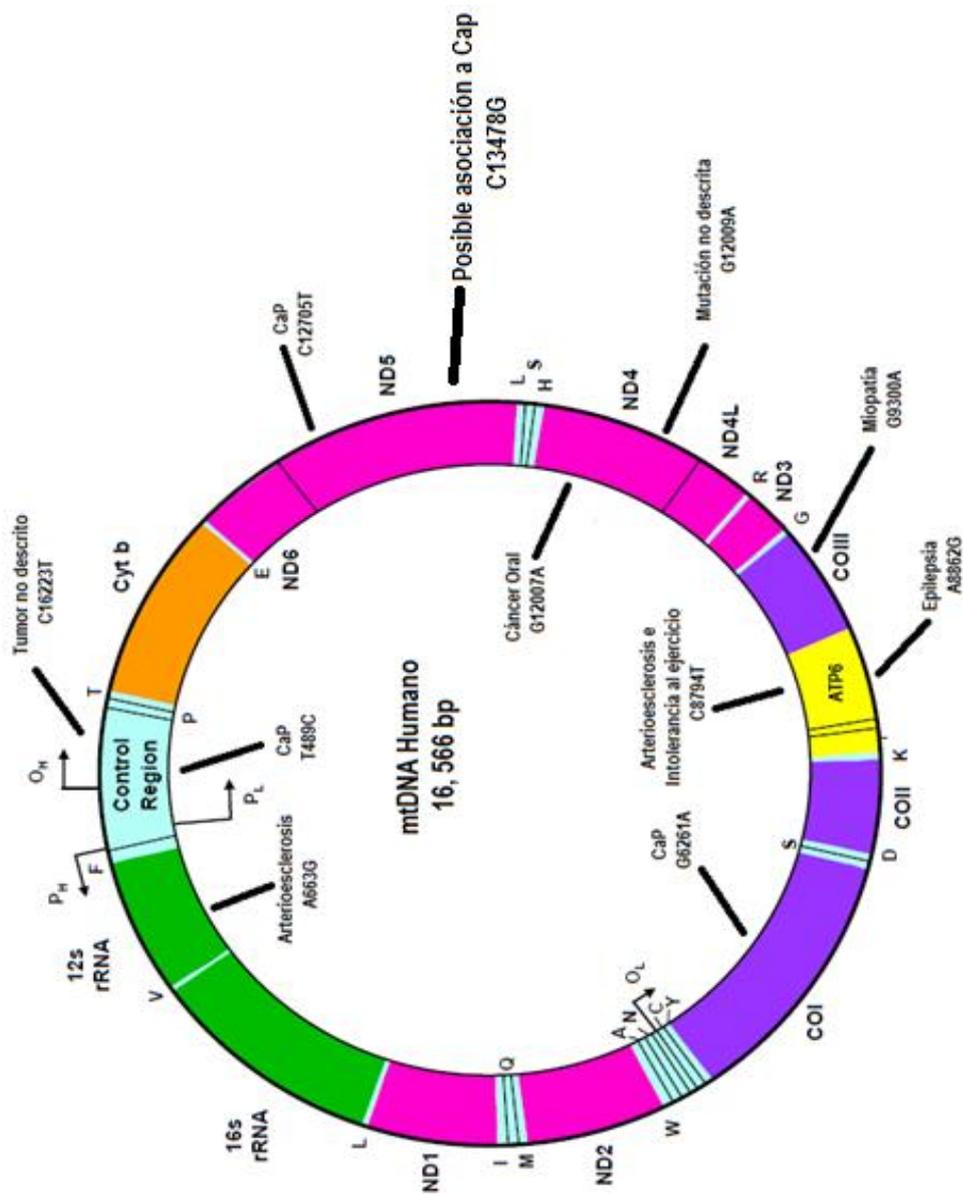


Figura R. 4. Representación Esquemática del Genoma Mitocondrial Humano.

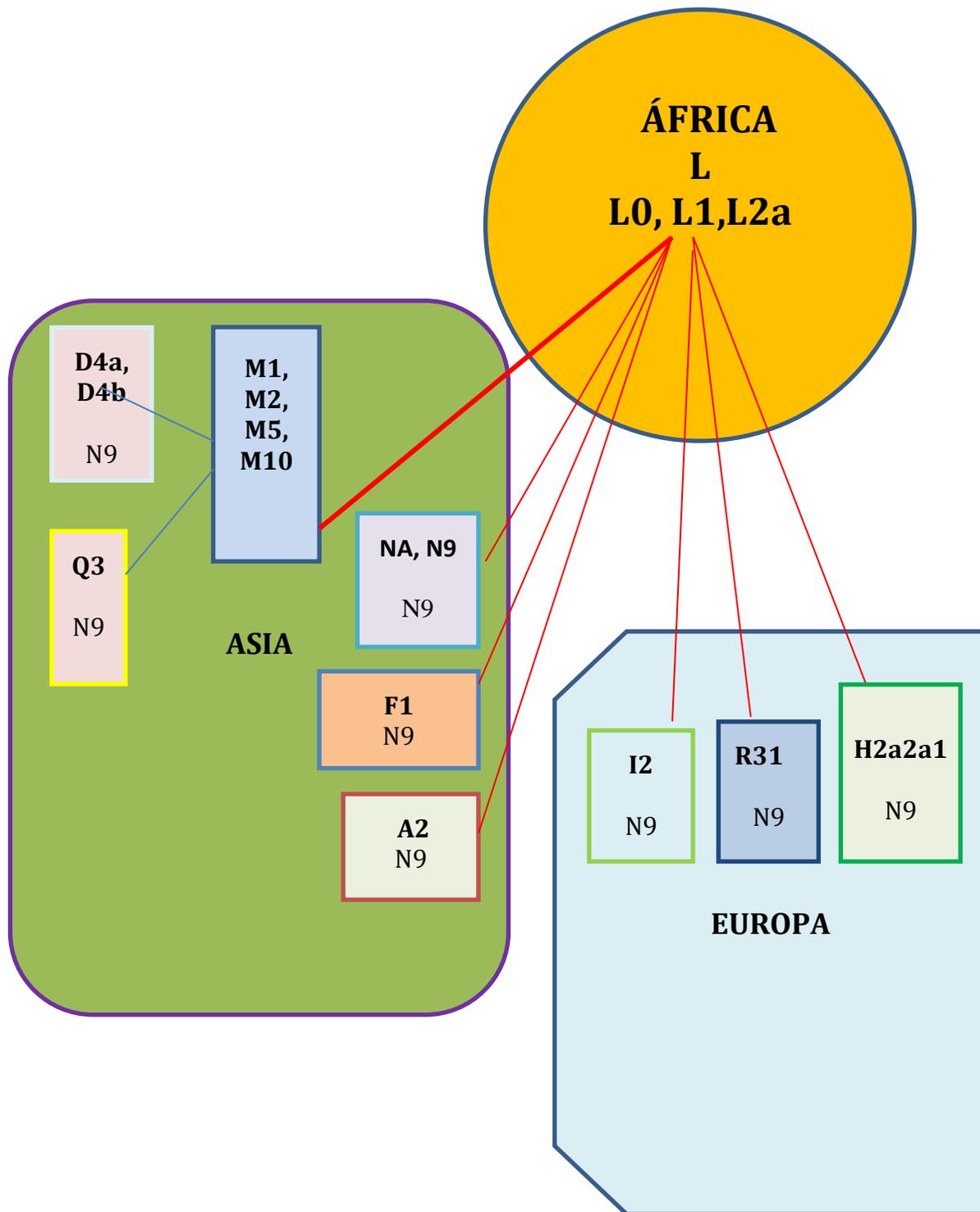


Figura R. 5. Red Filogenética Experimental de la muestra C+; C-.

Representación de la relación de los haplotipos (simbolizados con letra y número) localizados experimentalmente y su origen según el continente.

Resultados experimentales de las mutaciones G12009A y C13478G y su probable asociación al cáncer de próstata según la base de datos Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab también se muestra la comparación de secuencias en un electroferograma de la mutación C13478G.

Tabla R. 2. Mutación no descrita con cambio de aminoácido y su posible asociación al cáncer de próstata según Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab.

| P | NS | L | PA | SA | PP2p | Referencias |
|-------|-----|--------|-----|-----|--------|---|
| 12009 | G-A | MT-ND4 | 417 | G/D | Dañino | http://bioinformatics.css-mendel.it/index.php/tools/2014-01-10-22-56-33/web-service |

Tabla R. 3. Mutación C13478G presente en las muestras BT, PR, C+;C- con posible asociación al cáncer de próstata según Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab.

| P | NS | L | PA | SA | PP2p | M | Referencias |
|-------|-----|--------|------|-----|--------|-----------------|---|
| 13478 | C-G | MT-ND5 | 1381 | A/G | Dañino | BT,PR, C+,C- | http://bioinformatics.css-mendel.it/index.php/tools/2014-01-10-22-56-33/web-service |

Acotaciones

P: Posición; **NS:** Nucleótido Substituido; **L:** Locus; **PA:** Posición del Aminoácido; **SA:** Sustitución del Aminoácido; **PP2p:** Predicción PolyPhen2; **M:** Muestra
BT: Biopsia Transrectal; **PR:** Prostatectomía Radical; **C+:** Tejido Neoplásico; **C-:** Tejido Benigno.

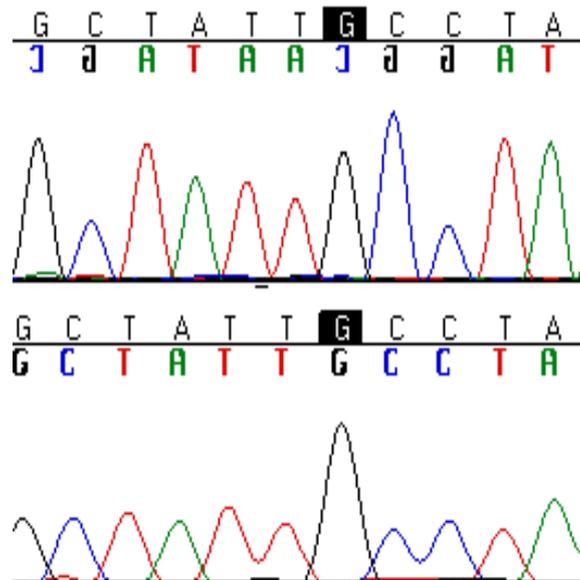


Figura R. 6. Electroferograma de la mutación C13478G presente en las muestras BT, PR, C+;C- con posible asociación al cáncer de próstata.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este estudio inicial piloto abarcó el análisis de tres muestras (BT: Biopsia Trasrectal; PR: Prostatectomía Radical, en estas muestras sólo se secuenció bidireccionalmente la región MT-ND5; C+: Tejido neoplásico y C-: Tejido sano procedente de una prostatectomía radical con secuenciación bidireccional de todo el genoma mitocondrial).

Se encontraron cuatro mutaciones asociadas al cáncer de próstata, T489C, C12705T, G6261A, C16223T; cabe destacar que estas son las primeras localizadas en México (ver Tabla R.1 Mutaciones y Polimorfismos Experimentales C+; C- y Figura R.3. Mutaciones localizadas experimentalmente asociadas al Cáncer de Próstata en la muestra C+; C-). A continuación se explicará el proceso biomolecular y metabólicos de dichas mutaciones.

Las mutaciones T489C y C16223T se encuentran en la parte MT-DLOOP, es una zona no codificante, actúa como promotor de las cadenas pesada y ligera del DNAm, y contiene elementos de transcripción esenciales. Las investigaciones por parte de Petros y Col. Expresan que este es un área sensible a variaciones en lo que respecta al CaP (Petros *et al.*, 2005). Chen y Col. Corroboran dicha investigación pues encontró 90% de mutaciones puntuales en el MT-DLOOP asociadas al CaP (Chen *et al.*, 2012).

Continuando con el análisis de Petros y Col. En un estudio realizado con 260 pacientes sometidos a la prostatectomía radical en Europa y América del Norte, reveló que alrededor del 11% del cáncer de próstata (CaP) tenía mutaciones en la región MT-COI, la mutación G6261A concuerda con una de las reportadas por Petros, dicha es de línea germinal y homoplásmica además de estar relacionada con los haplogrupos H y N. La conclusión de este estudio fue que las mutaciones en la línea germinal de la zona MT-COI pueden provocar CaP y que éstas pueden ser candidatas a desarrollar oncogenes (Petros *et al.*, 2005).

Cabe recordar que la región MT-COI, codifica para la subunidad I del citocromo oxidasa, la mutación G6261A non-syn: A-T, en otro orden de ideas, es una mutación no sinónima de transición, que genera un cambio de aminoácido de alanina (A) a treonina (T). Variaciones en esta área pueden afectar en la transferencia de electrones desde el citocromo C a oxígeno molecular, además de causar un declive en el ensamble de este supercomplejo y por ende desestabilizar su actividad (*Phillips et al., 2012*).

La mutación C12705T, localizada en el locus MT-ND5, dicho gen codifica para la proteína NADH deshidrogenasa 5, siendo parte del complejo I mitocondrial. Las mutaciones puntuales en esta zona generan un desequilibrio en el proceso de la fosforilación oxidativa. Esta variación mitocondrial ya ha sido estudiada por Jerónimo y Col., donde según sus indagaciones afirma que ésta y otras más demuestran la existencia de patrones específicos de mutaciones somáticas ADNmt en el cáncer de próstata (*Jerónimo et al 2001*).

La mutación G12009A en el locus MTND4, presentándose en ambos tejidos, C+ y C-, para determinar si ésta está relacionada a algún daño en este gen, se hizo uso de la herramienta bioinformática Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab, colección de predicciones pre-computarizadas relacionadas a mutaciones no sinónimas que afectan a los genes de las proteínas mitocondriales. El parámetro PP2p, **PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)**, es un instrumento que presagia el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína, para este tema el gen MT-ND4 contiene instrucciones para la construcción de la proteína NADH deshidrogenasa 4. Esta proteína es parte del sistema enzimático denominado complejo I altamente activo en la mitocondria. Las mutaciones en este locus incrementa la producción de ROS (Ver Tabla R.2. Mutación no descrita con cambio de aminoácido y su posible asociación al Cáncer de Próstata según Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab), (*Y. Wang et al., 2001*).

Las mutaciones T489C, G6261A, C16223T no solo se limitaron al tejido neoplásico sino también al sano sin embargo, esto se explica ya que las alteraciones moleculares que pueden indicar la presencia de un tumor, o contribuir a su

desarrollo, tienen lugar mucho antes de que las variaciones morfológicas malignas sean visibles. Alternativamente, la presencia de un tumor puede ejercer un denominado efecto de campo que conduce a los cambios moleculares que aparecen en el tejido histológicamente normal adyacente al tumor (*Ostronoff et al., 2010*). Este efecto de campo recientemente se ha demostrado en perfiles de expresión génica del cáncer de próstata (*Cook et al. 2012*).

Los cambios estudiados en el DNAm_t expresan un patrón de homoplasmia (mutación presente en todas las copias de DNAm_t de la célula prostática), recientemente se ha postulado que primeramente las mutaciones fueron heteroplásmicas, pero estas mutaciones son vitales para la supervivencia de la célula cancerígena por lo que eventualmente se convierte en una mutación homoplásmica (*Liu et al., 2012*).

Es de particular interés la tasa de mutación somática en los tejidos, neoplásico y sano, muy probablemente indica la pérdida de la estabilidad del genoma mitocondrial a pesar de los robustos mecanismos de reparación del DNAm_t, con orígenes nucleares, por lo que la mitocondria no puede ser capaz de reparar el incremento de lesiones del DNAm_t (*Wallace et al., 2012*).

A nivel bioquímico dichos cambios son el resultado de daños en los componentes de la cadena transportadora de electrones por lo que hay una pérdida significativa de energía expresada en ATP conduciendo a un error metabólico; sin embargo, este proceso para la célula maligna es un mecanismo de supervivencia, contribuyendo así al proceso carcinogénico siempre y cuando se supere el umbral de reparación mitocondrial (*Phillips et al., 2012*).

Tal vez el comportamiento del tumor y la agresividad de éste refieren a la forma y grado en que se rompe este umbral, en otro orden de ideas, en la clínica urológica es muy común que un paciente tenga un resultado negativo en la biopsia transrectal no obstante, después de un seguimiento como medida de control este diagnóstico sea sustituido por un cáncer de próstata metastático (*Y. Wang et al., 2001*). La pregunta es cómo sucedió este evento, pues según las investigaciones por Bardella & Co. se debe al aumento en frecuencia de mutaciones ligadas, tanto

sinónimas y no sinónimas en asociación con la progresión de la enfermedad (*Bardella et al., 2011*).

El aumento en la tasa de mutaciones no sinónimas en nuestros datos (ver Tabla R.1 Mutaciones y Polimorfismos Experimentales C+; C- mutaciones non-syn) apoya aún más las nociones del progreso neoplásico. Esto implica que el uso de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) específicos para diagnosticar algunas neoplasias y tumores malignos pueden ser poco práctico ya que se observa que la progresión tumoral prostática es un proceso de mutación acumulativa impulsado por los daños de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El incremento endógeno de ROS, proporciona un estímulo constante para la proliferación celular y lo más importante un daño tanto al DNAmT y el DNAn, lo que lleva al desarrollo del cáncer, la inestabilidad genética y la evolución de la enfermedad (*Phillips et al., 2012*).

El DNAmT es más vulnerable a los daños producidos por ROS, ya que éste se encuentra muy próximo a la cadena de transporte de electrones, la fuente de ROS a nivel mitocondrial. El DNAmT al carecer de histonas tiene una limitada capacidad de reparación por lo que aumenta la sensibilidad a lesiones ocasionadas por ROS y por ende a una mayor proliferación de mutaciones (*Fogg et al., 2011*).

Algo interesante de este estudio fue que se encontró la mutación C13478G, en las muestras BT: Biopsia Trasrectal; PR: Prostatectomía Radical; C+: Tejido neoplásico y C-: Tejido sano procedente de una prostatectomía radical. Dicha variación aún no está descrita asociada al CaP, sin embargo, con el uso de la base de datos ya mencionada anteriormente, Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab, (Ver tabla Tabla 8.3. Mutación C13478G presente en las muestras BT, PR, C+;C- con posible asociación al Cáncer de Próstata según Mitlmpact CSS Bioinformatics Lab y Figura R.6. Electroferograma de la mutación C13478G presente en las muestras BT, PR, C+;C- con posible asociación al Cáncer de Próstata), en este caso el parámetro PP2p marcó un probable daño a una de las proteínas del locus MTND5, una zona reportada con mutaciones afiliadas al cáncer de próstata (*Jeronimo et al 2001*).

Para comprobar experimentalmente si esta mutación asociada al CaP altera la función de las proteínas COI, ND4 y ND5 sería necesario realizar una prueba de

inmunohistoquímica en el tejido neoplásico y sano. La hipótesis sería que el tejido sano sería positivo para la proteína COI y ND5 respectivamente, mientras que el tejido neoplásico sería negativo (*Petros et al., 2005*).

De igual manera el examen de las mutaciones del DNAm_t revelaron las siguientes alteraciones asociadas a las siguientes enfermedades: G9300A, Miopatía, (*Rajkumar et al., 2005*); A663G, Arterioesclerosis Coronaria (*Sawabe et al., 2011*); C8794T, Arterioesclerosis Coronaria e Intolerancia al Ejercicio (*Sawabe et al., 2011*); y G12007A, Cáncer Oral (*Malyarchuk et al., 2005*). Sin embargo, no corresponde a este trabajo examinar dichas mutaciones, pero no por ello no es importante mencionarlas pues las mismas ya se encuentran adecuadamente descritas en bases de datos especializadas (*mitomap.org*).

Mediante los haplogrupos mitocondriales, obtenemos información geográfica pues, cada haplogrupo es característico de una región lo que representa una información muy valorada, en este caso el paciente de la muestra C+, C- presenta un subclado A2, proviene del Haplogrupo A, el cual tiene un origen en Asia hace 30.000 a 50.000 años, tiene mayor predominio en Norteamérica septentrional. Es mayoritario en frecuencia, predomina en los mixtecos (73-93 %), mayas (53-84 %) aztecas (65 %). El subclado A2 es típico de los pueblos indígenas americanos y de nativos del Lejano Oriente siberiano, especialmente en chukchis y esquimales (*Fagundes et al., 2012*).

Se localizaron varios haplotipos y subclados en la muestra C+, C-, entre los más antiguos son de origen africano, los que destacan:

Haplogrupo L0, predomina en África Austral, es el más antiguo, con 140.000 a 170.000 años, es el que tiene una relación estrecha con el ancestro en común de todos los seres humanos por línea materna: La "Eva Mitocondrial", este haplogrupo se presenta una alta frecuencia en los pueblos khoisán. Haplogrupo L1, se localiza en el Oeste y parte central del África subsahariana y es predominante en los pigmeos occidentales mbenga, se cree que tiene 125.000 a 150.000 años de

antigüedad. Por último se localizó el haplotipo L2a cuya alta frecuencia se presenta en la población no-bantú de África Oriental (*Klyosov & Rozhanskii, 2012*).

De igual manera se pudo rastrear en la muestra haplogrupos europeos como por ejemplo: El I2, muy común en Bosnia (55%), Croacia (38%) y Serbia (33%). El haplogrupo R31, el cual se encuentra en los grupos étnicos indios (Andhra Pradesh y Uttar) y el haplotipo H2a2a1 típico de Europa Oriental en especial Chuvasia y el Cáucaso (*Sharma et al, 2005*).

Entre los haplogrupos asiáticos se localizaron el Q3, de los Papúes de Nueva Guinea y Nueva Bretaña; el haplotipo D4aD4b, extendido en el Extremo Oriente con alta frecuencia en Tailandia (80%). El Haplogrupo M con sus subgrupos M1, M2, M5 Y M10, los descendientes de éste están esparcidos por todos los continentes en especial en Eurasia Oriental con una antigüedad de 60.000 a 65.000 años, se cree que se originó en la India. El clado F1, el más importante y distribuido en Asia Oriental, Indochina, Sur de Siberia con 40.000 y 50.000 años de antigüedad. Por último se encontró el macrohaplogrupo N con sus variantes NA y N9, éste es el más próximo derivado al haplogrupo L3. Dicho haplogrupo corresponde a las hipótesis sobre las migraciones prehistóricas del ser humano fuera de África representando así la expansión de la humanidad por todo Eurasia (*Behar et al, 2006*).

La importancia de este examen filogenético radica en el hecho de que la muestra C+ y C. que mostro una posible predisposición al Cap definido por la mutación C12705T asociada de igual manera al haplogrupo R, usual en Euroasia. Varios autores han demostrado grandes diferencias con respecto al riesgo de Cap entre los hombres de diferentes orígenes étnicos (*Booker et al, 2006*).

Existe una gran variación geográfica en las frecuencias de haplogrupos sobre todo en México, con gran diversidad de la población determinado por la mezcla de indígenas, europeos y africanos. *Kim et al* en sus hallazgos no encontró alguna asociación del riesgo de Cap y la población americana (*Kim et al, 2008*). (Ver. Figura R.5. Red Filogenética Experimental de la muestra C+;C-).

Sin embargo, para comprender plenamente la importancia de los estudios basados en haplogrupos poblacionales y el riesgo de Cap, se deben tomar en cuenta más marcadores ancestrales para establecer una correlación exacta con la susceptibilidad a esta enfermedad.

Tras el análisis anterior aún queda la siguiente pregunta por contestar, ¿Podría la información proporcionada por las mutaciones del DNAm asociadas al CaP ser de provecho para el manejo clínico de los pacientes? Aún no lo sabemos sin embargo, este estudio es apenas el preámbulo para considerar las alteraciones en el DNAm como un biosensor útil para la detección temprana y seguimiento del cáncer de próstata, dada la singularidad de la molécula y la hipermutagénesis de ésta.

El alto número de copias del DNAm, junto con las mutaciones asociadas al CaP, y en algunos casos, la naturaleza de las mutaciones, homoplásmicas, probablemente confiera una ventaja en la detección en sangre usando métodos más específicos como los microarreglos (MitoChip)

CONCLUSIONES

Se lograron analizar las mutaciones y polimorfismos del DNA mitocondrial (mtDNA) en pacientes mexicanos con cáncer de próstata (CaP); mediante el empleo de técnicas moleculares, PCR punto final y secuenciación biparalela; identificándose las siguientes variaciones candidatas al CaP: T489A, G6261A, G12009A, C12705T, C13478G, C16223T procedentes de biopsia transrectal y prostatectomía radical, examinando así el comportamiento del cáncer de próstata en el genoma mitocondrial

Se consiguió extraer el ADN genómico mediante Silica-Based Method-Dneasy Tissue Kits™ a partir de tejido prostático benigno y maligno, empleados como control negativo y positivo, respectivamente; para amplificar el genoma mitocondrial con la técnica reacción en cadena de la polimersa (PCR) punto final y purificar los fragmentos obtenidos con el método de purificación en columna-Purelink™ Invitrogen.

Se realizó una secuenciación biparalela de los productos purificados de PCR en la cual no sólo se localizaron las mutaciones candidatas al CaP sino también las siguientes asociadas a otras patologías: A663G (Arterioesclerosis), G12007A (Cáncer Oral), C8794T (Arterioesclerosis e intolerancia al ejercicio) y A8862G (Miopatía).

Mediante el análisis filogenético con el uso de la herramienta bioinformática Mitomap™ se pudieron estudiar los haplogrupos de la muestra C+, C- la cual presentó principalmente un subclado A2, proviene del haplogrupo A común en América Latina, de igual manera se reconoció al haplogrupo R, (típico en Euroasia) asociado, según los reportes de *Booker et al*, a la mutación C12705T candidata al CaP.

ANEXOS

LISTA DE PRIMERS DEL MTDNA

^aF corresponde al sentido 5' a 3'

^bR corresponde al sentido 3' a 5'

| Primer | Secuencia del Primer * 5'-3' | Posición | Tm (°C) |
|-----------------|--------------------------------|----------|---------|
| 1F ^a | CTC CTC AAA GCA ATA CAC TG | 661 | 58 |
| 1R ^b | TGC TAA ATC CAC CTT CGA CC | 1411 | 60 |
| 2F | CGA TCA ACC TCA CCA CCT CT | 1245 | 62 |
| 2R | TGG ACA ACC AGC TAT CAC CA | 2007 | 60 |
| 3F | GAC TAA CCC CTA TAC CTT CTG | 1851 | 62 |
| 3R | GGC AGG TCA ATT TCA CTG GT | 2669 | 60 |
| 4F | AAA TCT TAC CCC GCC TGT TT | 2499 | 58 |
| 4R | AGG AAT GCC ATT GCG ATT AG | 3346 | 58 |
| 5F | TAC TTC ACA AAG CGC CTT CC | 3169 | 60 |
| 5R | ATG AAG AAT AGG GCG AAG GG | 3961 | 60 |
| 6F | TGG CTC CTT TAA CCT CTC CA | 3696 | 60 |
| 6R | AAG GAT TAT GGA TGC GGT TG | 4660 | 62 |
| 7F | ACT AAT TAA TCC CCT GGC CC | 4485 | 60 |
| 7R | GGA ATG GGG TGG GTT TTG TA | 5426 | 60 |
| 8F | CTA ACC GGC TTT TTG CCC | 5255 | 56 |
| 8R | ACC TAG AAG GTT GCC TGG CT | 6031 | 62 |
| 9F | GAG GCC TAA CCC CTG TCT TT | 5854 | 62 |
| 9R | ATT CCG AAG CCT GGT AGG AT | 6642 | 60 |
| 10F | CTC TTC GTC TGA TCC GTC CT | 6469 | 62 |
| 10R | AGC GAA GGC TTC TCA AAT CA | 7315 | 58 |
| 11F | ACG CAA AAA TCC ATT TCA CT | 7148 | 60 |
| 11R | CGG GAA TTG CAT CTG TTT TT | 8095 | 56 |
| 12F | ACG AGT ACA CCG ACT ACG GC | 7927 | 64 |
| 12R | TGG GTG GTT GGT GTA AAT GA | 8797 | 58 |
| 13F | TTT CCC CCT CTA TTG ATC CC | 8621 | 60 |
| 13R | GTG GCC TTG GTA TGT GCT TT | 9397 | 60 |
| 14F | CCC ACC AAT CAC ATG CCT AT | 9230 | 60 |
| 14R | TGT AGC CGT TGA GTT GTG GT | 10130 | 60 |
| 15F | TCT CCA TCT ATT GAT GAG GGT CT | 9989 | 64 |
| 15R | AAT TAG GCT GTG GGT GGT TG | 10839 | 60 |
| 16Fn | CCC TAC TAG TCT CAA TCT CC | 10715 | 60 |
| 16Rn | CAT AGC CGC CTA GTT TTA AG | 11464 | 58 |
| 17F | TCA CTC TCA CTG CCC AAG AA | 11314 | 60 |
| 17R | GGA GAA TGG GGG ATA GGT GT | 12076 | 62 |
| 18F | TAT CAC TCT CCT ACT TAC AG | 11948 | 56 |
| 18R | AGA AGG ATA TAA TTC CTA CG | 12774 | 54 |
| 19F | AAA CAA CCC AGC TCT CCC TAA | 12571 | 62 |
| 19R | TCG ATG ATG TGG TCT TTG GA | 13507 | 58 |
| 20F | ACA TCT GTA CCC ACG CCT TC | 13338 | 62 |
| 20R | AGA GGG GTC AGG GTT GAT TC | 14268 | 62 |
| 21F | GCA TAA TTA AAC TTT ACT TC | 14100 | 64 |
| 21R | AGA ATA TTG AGG CGC CAT TG | 14998 | 58 |
| 22F | TGA AAC TTC GGC TCA CTC CT | 14856 | 60 |
| 22R | AGC TTT GGG TGC TAA TGG TG | 15978 | 60 |
| 23F | TCA TTG GAC AAG TAG CAT CC | 15811 | 58 |
| 23R | GAG TGG TTA ATA GGG TGA TAG | 11 | 58 |
| 24F | CAC CAT CCT CCG TGA AAT CA | 16420 | 58 |
| 24R | AGG CTA AGC GTT TTG AGC TG | 775 | 58 |



SOCIEDAD DE BENEFICENCIA ESPAÑOLA I.A.P.
DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

B-1857-13

Nombre: **Waldo Rodríguez Valenzuela**
Médico: **Sergio Ureta Sánchez**
Especímenes recibidos: **Bx. de próstata**
Fecha y hora de recepción: **28-Mayo-2013 15:54 hrs.**
Fecha de inclusión: **28-Mayo-2013**
Fecha de diagnóstico: **03-Junio-2013**

Edad: **70 a** Sexo: **Masculino**
Expediente: **522147**
No. paciente: **293523**
Piso: **5°** Cama: **5109**
Socio: sí no

Información clínica proporcionada: Paciente con APE de 20 años, próstata de 2.3x2.0 cm, de consistencia pétreo, con un nódulo papiloso en lóbulo izquierdo y tumor nudo tortado.

DIAGNÓSTICO:

1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.- **BIOPSIAS TRANSRECTALES DE LA PRÓSTATA:**
- **FIBRAS DE MÚSCULO ESTRIADO CON ARTIFICIO POR ELECTROFULGURACIÓN.**

8.- **PRODUCTO DE RESECCIÓN TRANSURETRAL DE PRÓSTATA:**
- **ADENOCARCINOMA POCO DIFERENCIADO, GRADO 4+4 DE GLEASON, SUMA DE GLEASON 8, EN EL 96% DEL MATERIAL ESTUDIADO.**

Comentario: se descartó la posibilidad de diferenciación neuroendocrina.

RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

| | |
|--------------------------------|----------|
| Antígeno prostático específico | Negativo |
| Citoqueratina 8/18 | Positivo |
| Factorasa ácida prostatica | Positivo |
| Cromogranina | Negativo |
| Sinaptofisina | Negativo |
| CD58 | Negativo |

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

- 1.- Nódulo izquierdo pétreo en formal, fragmento blando de tejido que mide 0.2 cm de longitud por 0.1 cm de diámetro. Es blanquecino y blando. Se incluye íntegro en casete 1.
- 2.- Lóbulo derecho zona pétreo: en formal, fragmento de tejido que mide 0.4 cm de longitud y que es de características similares al anterior. Se incluye íntegro en casete 2.
- 3.- Lóbulo derecho porción media lateral: en formal, fragmento de tejido de 0.6 cm de longitud, de características similares a los anteriores. Se incluye íntegro en casete 3.
- 4.- Basal derecho: en formal, fragmento irregular de tejido de 0.1 cm de eje mayor. Es blanquecino y blando. Se incluye íntegro en casete 4.
- 5.- Basal izquierdo: en formal, un fragmento irregular de tejido de 0.1 cm de eje mayor. Es blanquecino y blando. Se incluye íntegro en casete 5.
- 6.- Apical izquierdo: en formal, dos fragmentos de tejido de forma irregular que ocupan en conjunto un volumen de menos 0.1 cc. Son blanquecinos y blandos. Se incluyen íntegros en casete 6.
- 7.- Medial apical izquierdo: en formal, tres fragmentos de tejido de forma irregular que ocupan en conjunto un volumen de 0.1 cc. Son blanquecinos y blandos. Se incluyen íntegros en casete 7.
- 8.- En formal, producto de RTUP. Son varios fragmentos de tejido en forma de hojuela que pesan en conjunto 7 g y miden 4.0x3.8x1.2 cm. Son café claro y de consistencia alveolar, se incluyen íntegros en casetes 8 a 11.

Dra. Alejandra Zárate Osorio
CP-734024
A201emh

Av. Ejercito Nacional No. 913 Cui. Granada Mexico, D.F., 11024 Tel: 5255-9696 www.hospital2000.com
Hospital Certificado por la Secretaría de Salud



HOSPITAL ESPAÑOL

México, D.F. a 07 de Junio del 2013.

MEDICO SOLICITANTE: DR. SERGIO URETA SANCHEZ
PACIENTE: RODRIGUEZ VALENZUELA WALDO
SEXO: MASCULINO **EDAD:** 75 AÑOS **HORA:** 10:30
CAMA: EXTERNO **PACIENTE No.:** 217011

CENTELLOGRAFIA OSEA:

METODO:

Atendiendo a su amable solicitud se realizó centellografía ósea previa administración endovenosa una dosis de Miften Difenato (MDP-32mCi), obteniéndose imágenes a las 3 horas posteriores en proyecciones anterior y posterior así con imágenes sagitales.

DESCRIPCIÓN:

Se aprecia concentración del radiotrazador por las estructuras óseas con distribución heterogénea. Se observan múltiples zonas de aumento de la concentración, localizadas en:

- > En cráneo en región maxilar y nasal
- > A nivel de grandes articulaciones de forma asimétrica en codos, muñecas, sacro-iliacas, rodillas y tobillos, en forma asimétrica en hombros, lesiones esternoclaviculares por proniosis izquierda-derecha
- > En torso a nivel de humero izquierdo
- > En 3ª y 10ª arco costales posteriores izquierdos, a nivel de cuerpos vertebrales T4 y T8, L2, L4-5.
- > Múltiples a nivel de pelvis en forma bilateral.

Se observan otros niveles de características normales, en datos de pelvis fase derecha

CONCLUSIÓN:

- 1.- CENTELLOGRAFIA OSEA POSITIVA PARA PATOLOGIA INFILTRATIVA.
- 2.- LAS LESIONES OSTEOASTICAS OBSERVADAS A NIVEL DE GRANDES ARTICULACIONES ESTÁN MÁS EN RELACIÓN CON UN PROCESO OSTEODEGENERATIVO/INFLAMATORIO.
- 3.- A NIVEL DE REGIÓN NASOBUCAL, PROBABLEMENTE ES SECUNDARIA A UN PROCESO INFLAMATORIO Y/O INFECCIOSO.

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ MANUEL ÁLVAREZ ZAVALA
 C.O. PROFESIONAL 138841
 C.O. ESPECIALIDAD 88206-0411

146-721
1470000-000000

Este documento es propiedad de Hospital Español y no debe ser distribuido fuera de sus instalaciones. Si usted es un proveedor de servicios, por favor contactar al Departamento de Cobros de Hospital Español, al teléfono: 52-55-96-00-0000 o al correo electrónico: ventas@hospital.com

SOCIEDAD DE BENEFICENCIA ESPAÑOLA, I.A.P.
 AV. EJERCITO NACIONAL No. 613 • COL. GRANADA, MEXICO, D.F. C.P. 11520 • TEL. 52-55-96-00
www.benepl.com

F-26

REFERENCIAS

-
1. American Cancer Society (ACS). 2012. Guía detallada del Cáncer del Próstata. <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/index>
Fecha de Consulta: 24 agosto 2013.
 2. American College of Physicians. Screening for prostate cancer. *Ann Intern Med*; **126**:480-4(1997).
 3. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, et al. "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA". *N. Engl. J. Med*; **341**:1037-44 (2004).
 4. Andriole GL, Grubb RL, Buys SS, et al. Mortality results from a randomized prostate cancer screening trial. *N Engl J Med*; **360**:1310-1319 (2009).
 5. Baldwin KC; Ginsberg PC; Roehrborn CG; Harkaway RC: Discontinuation of alpha-blockade after initial treatment with finasteride and doxazosin in men with lower urinary tract symptoms and clinical evidence of benign prostatic hyperplasia. *Urology*; **58**(2):203-9 (2001).
 6. Bardella, C., Pollard, P. J. & Tomlinson, I. SDH mutations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1432-1443 (2011).
 7. Beardslie T. A War Not Won. Trends in Cancer Epidemiology. *Sc. American*. 1994. 118-125.
 8. Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, et al. The matrilineal ancestry of Ashkenazi Jewry: portrait of a recent founder event. *American Journal of Human Genetics* **78** (3): 487-97 (2006).
 9. Beuzeboc P, Soulié M, Richaud P, Salomon L, Staerman F, Peyromaure M, Mongiat-Artus P, Cornud F, Paparel P, Davin JL, Molinié V "Fusion genes and prostate cancer. From discovery to prognosis and therapeutic perspectives". *Prog. Urol.* **19** (11): 819-24 (2009).

-
10. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA and Holt IJ. "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone". *J. Biol. Chem*; **278**:50961-69 (2013).
 11. Booker, G. M. Habermacher, B. Jessie, et al., "North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer," *Journal of Urology*; **175**:468-473 (2006).
 12. Breslow N, Chan CW, Dhom G, Drury RA, Franks LM, Gellei B, Lee YS, Lundberg S, Sparke B, Sternby NH, Tulinius H. "Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France". *Int J Cancer* **20** (5): 680-8 (1977).
 13. Brown TA and Clayton DA. "Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA". *Cell Cycle*; **5**:917-21 (2006).
 14. Cano D, Gomez CF, Ospina N. "Mitochondrial DNA Haplogroups and Susceptibility to Prostate Cancer in a Colombian Population" *Hindawi Oncology*. **10**:1155. Article Id. 530675. (2014).
 15. Chen, N. Gokden, G. F. Greene, P. Mukunyadzi, and F. F. Kadlubar, "Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection," *Cancer Research*. **62**:22:6470-6474.(2012).
 16. Clayton DA. "Replication of animal mitochondrial DNA". *Cell*. **28**:693-705 (1982).
 17. Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet*; **28**:147-150 (2011).
 18. Cook CC, Higuchi M. The awakening of an advanced malignant cancer: an insult to the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* **1820** (5): 652-662 (2012).

-
19. Croteau DL and Bohr VA, "Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells," *Journal of Biological Chemistry*. **272**:4, 25409–25412.(1997).
 20. Dakubo, R. L. Parr, L. C. Costello, R. B. Franklin, and R. E. Thayer, "Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer," *Journal of Clinical Pathology*.**59**:1.10–16.(2006).
 21. Dennis, LK; Dawson, DV. "Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer." *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **13** (1): 72–9 (2002).
 22. DiMauro S, Moraes C. "Mitochondrial encephalomyopathies". *Arch. Neuro*;**30**:1197-1208 (1993).
 23. DiMauro S, Schon EA: Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet*;**106**:18-26 (2001).
 24. DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P, Tanji K, Sano M, Shungu DC, et al. "Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers". En: Fahn S, Frucht SJ, *Lippincott Williams & Wilkins*.**1**: 217-29 (2005).
 25. Enriquez JA, Fernandezsilva P, Perezmatos A, Lopezperez MJ and Montoya J. "The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP". *Eur. J. Biochem*; **237**:601-10 (2010).
 26. Fagundes, Nelson J.R.; Ricardo Kanitz, Roberta Eckert, Ana C.S. Valls, Mauricio R. Bogo, Francisco M. Salzano, David Glenn Smith, Wilson A. Silva, Marco A. Zago, Andrea K. Ribeiro-dos-Santos, Sidney E.B. Santos, Maria Luiza Petzl-Erler, and Sandro L.Bonatto. Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas . *American Journal of Human Genetics* **82** (3): 583–592 (2008).
 27. Fisher RP and Clayton DA. "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1". *Mol. Cell Biol*; **8**:3496-3509 (1988).

-
28. Fogg VC, Lanning NJ, Mackeigan. JP. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer*; **30**(8): 526-39 (2011).
29. Gray Mw. "Origin and evolution of organelle genomes". *Curr. Op. Genet. & Devel*; **3**:884-90 (1993).
30. Giovanucci E, Platz EA. Epidemiology of prostate cancer. In: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Debruyne FMJ, Linehan WM, eds. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2006:9-21.
31. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, Ries LA, Merrill RM, Kaplan RS "Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer—part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates". *J Natl Cancer Inst* **91** (12): 1017–24 (2006).
32. Hsing AW, Chokkalingam AP. "Prostate cancer epidemiology". *Frontiers in Bioscience* **11**: 1388–413 (2006).
33. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W: Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*; **407**:390-395 (2000).
34. Hoffman RM, Gilliland FD, Eley JW, Harlan LC, Stephenson RA, Stanford JL, Albertson PC, Hamilton AS, Hunt WC, Potosky AL: Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer. Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl. Cancer Inst*; **93**(5):388-95 (2001).
35. Holt IJ, Lorimer HE and Jacobs HT. "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA". *Cell*; **100**:515-524 (2000).
36. Holtgrewe HL: Surgical management of benign prostatic hyperplasia in 2001-a pause for thought. *The Journal of urology*. 2001 Jul, 166(1):177 (2001).

-
37. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.
38. Jeronimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D: Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene*; 20:5195-5198 (2001).
39. Jessie BC, Sun CQ, Irons HR, Marshall FF, Wallace DC, Petros JA: Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Exp Gerontol*; 37:169-174 (2001).
40. J. E. Fowler Jr., S. A. Bigler, G. Bowman, and N. K. Kilambi, "Race and cause specific survival with prostate cancer: influence of clinical stage, Gleason score, age and treatment," *Journal of Urology*; **163**. 1:137-142 (2000).
41. Kasamatsu H and Vinograd J. "Replication of circular DNA in eukaryotic cells". *Ann. Rev. Biochem*; **43**:695-719 (1974).
42. Kim, T.-K. Yoo, D.-J. Shin et al., "Mitochondrial DNA haplogroup analysis reveals no association between the common genetic lineages and prostate cancer in the Korean population," *PLoS ONE*; **3**. 5. Article ID e2211 (2008).
43. Klyosov, A.; Rozhanskii, I. Re-Examining the "Out of Africa" Theory. *Scientific Research*: 80-86 (2012).
44. Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH: Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*; **9**:517-526 (2012).

-
45. Lehtonen M. "Mitochondrial DNA sequence variation in patients with sensorineural hearing impairment and in the Finnish population". *Academic dissertation. University of Oulu. Finland* (2012).
46. Liu SL, Lin X, Shi DY, Cheng J, Wu CQ, Zhang YD: Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch Biochem Biophys*; **406**:173-182 (2012).
47. López E. "Defectos en el DNA mitochondrial asociados a enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa". Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España (2007).
48. L. T. Amundadottir, P. Sulem, J. Gudmundsson et al., "A common variant associated with prostate cancer in European and African populations," *Nature Genetics*; **38**,6:652-658 (2006).
49. Luque J y Herráez A. "Biología molecular e ingeniería genética". Ediciones Harcourt. Madrid, España (2011).
50. Montoya J, Gaines GL and Attardi G. "The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units". *Cell*; **34**: 151-9 (1983).
51. Mueller, W. Eder, J. A. Mayr et al., "Mitochondrial haplogroups and control region polymorphisms are not associated with prostate cancer in Middle European caucasians," *PLoS ONE*.4.7, Article ID e6370. (2009).
52. OECD. ORGANIZACIÓN ECONÓMICA DE DESARROLLO Y COMERCIO. "OBESITY UPDATE 2012". <http://www.oecd.org/health/49716427.pdf>. Consultado 15 de diciembre 2013.
53. Ornish D, Weidner G, Fair WR, et al. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. *J Urol*; **174**:1065-1069 (2005).

-
54. Ostronoff KL, Izquierdo JM, Enriquez JA, Montoya J, and Cuezva JM. "Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation". *Biochem. J*; **316**:183-191(2010).
55. Peñaloza R, Arenas D, Cerda R, Buentello L, González G, Torres J, Álvarez B, Mendoza I, Flores M, Sandoval L, Loeza F, Ramos I, Muñoz L, Salamanca F. "Characterization of mtDNA Haplogroups en 14 Mexican Indigenous Populations". *Human Biology*; **79**(3):313-320 (2007).
56. Petros, A. K. Baumann, E. Ruiz-Pesini et al., "MtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ.***102**:3,719–724.(2005).
57. Phillips, D. *et al.* Regulation of oxidative phosphorylation complex activity: effects of tissue-specific metabolic stress within an allometric series and acute changes in workload. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**, R1034–R1048 (2012).
58. Prieto-Martin A, Montoya J, and Martinez-Azorin F. "New DNA-binding activity of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF)". *J. Biochem. (Tokyo)*; **136**:825-30 (2012).
59. Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ y Sykes BC. "Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe". *Ann. Hum. Genet*; **62**:241-260 (1998).
60. Rundle A. "Obesity and screening PSA levels among men undergoing an annual physical exam". *The Prostate*; **68** (4): 373-380 (2013).
61. Ruíz S JL, García GU, Ochoa MR, Corona MV, Gutiérrez AG, León JC, Barrinagarrementería F. "Citopatías mitocondriales, imágenes y revisión". *Rev. Mex. Neuroci*; **3**(4):191-204 (2012).

-
62. Sarma, AV; McLaughlin, JC; Wallner, LP; Dunn, RL; Cooney, KA; Schottenfeld, D; Montie, JE; Wei, JT. "Sexual behavior, sexually transmitted diseases and prostatitis: the risk of prostate cancer in black men.". *The Journal of urology* **176** (3): 1108-13 (2006).
63. Schurr TG. "Mitochondrial DNA and the peopling of the new world". *National Academic of Sciences, USA*; **91**:1158-62 (2010).
64. Sharma S, Saha A, Rai E, Bhat A, Bamezai R. "Human mtDNA hypervariable regions, HVR I and II, hint at deep common maternal founder and subsequent maternal gene flow in Indian population groups". *Journal of Human Genetics* **50** (10): 497-506 (2005).
65. Singh KK, editor: Mitochondrial DNA Mutations in Aging, Disease, and Cancer. *Springer New York NY* (1998).
66. Smith MR, Egerdie B, Hernández Toriz N, et al; Denosumab HALT Prostate Cancer Study Group. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med*; **36**:745-755 (2009).
67. Solano A, Playán A, López P MJ, Montoya J. "Genetic diseases of the mitochondrial DNA". *Salud Pública*; **43**(2):151-161 (2011).
68. Strachan T y Read A. "Genética Humana". 3ª edición. Ed. McGraw Hill. D.F. México (2004).
69. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. "Family history and the risk of prostate cancer" *Prostate* **17** (4): 337-47 (1999).
70. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA "The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews". *N. Engl. J. Med.* **336** (20): 1401-8 (1997).

-
71. Talarico T, Cullinane CM, Gray PJ, Webster LK, Deacon GB, Phillips DR: Nuclear and mitochondrial distribution of organoamidoplatinum (II) lesions in cisplatin-sensitive and -resistant adenocarcinoma cells. *Anticancer Drug Des*; **16**:135-141 (2011).
72. Taylor RW and Turnbull DM. "Mitochondrial DNA mutations in human disease". *Nature Reviews Genetics*; **6**:389-402 (2005).
73. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML & Wallace DC. "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations". *Genetics*; **144**:1835-1850 (1996).
74. Wallace DC. "Diseases of the mitochondrial DNA". *Annu. Rev. Biochem*; **61**:1175-1212 (1992).
75. Wallace, D.C: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*; **283**:1482-1488 (1999).
76. Wallace, D. C: Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*; **70**, 363-374 (2005).
77. Wallace, D.C: Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer* **12**:685-698 (2012).
78. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. 2006. "Biología molecular del gen". 5a edición. Editorial medica panamericana. Madrid, España. Pp: 509.
79. X.-Y. Li, Y.-B. Guo, M. Su, L. Cheng, Z.-H. Lu, and D.-P. Tian, "Association of mitochondrial haplogroup D and risk of esophageal cancer in Taihang Mountain and Chaoshan areas in China, *Mitochondrion*; **11**. 1:27-32, (2011).
80. Y.Wang, Y. Michikawa, C. Mallidis, Y. Bai, L.Woodhouse, K.E. Yarasheski, C.A. Miller, V. Askanas, W.K. Engel, S. Bhasin, G. Attardi, Muscle-specific mutations accumulate

with aging in critical human mtDNA control sites for replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 4022–4027.

81. Zhou Y, Hileman EO, Keating MJ, Huang P: Correlation between superoxide generation and cellular response to the anticancer agent 2-methoxyestradiol in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Am Ass Cancer Re*; **43**:798 (2012).

