



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de mutaciones en el gen del receptor de andrógenos de pacientes mexicanos con cáncer de próstata

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Alejandra Pamela González Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Greco Hernández Ramírez
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mayel del Valle Chirinos Espin
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

No te rindas por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero.

Mario Benedetti

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Listado de abreviaturas	v
Antecedentes	
ANDRÓGENOS	
• Acciones de los andrógenos	1
• Síntesis de andrógenos	2
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA)	
• Organización estructural y función: gen y polipéptido	6
• Interacción con proteínas	9
• Mutaciones	10
• Rol del RA en el cáncer de próstata	11
CÁNCER DE PRÓSTATA	
• Anatomía y fisiología de la próstata	12
• Enfermedades más frecuentes	13
• Epidemiología	14
• Detección	14
• Tratamiento	16
• Factores de Riesgo	18
• CaP, RA y origen étnico	19
OBJETIVO	
• Objetivo general	21
• Objetivos particulares	21
MATERIALES Y METODOLOGÍA	
• Muestras clínicas	22
• Extracción del ADN genómico	22
• Amplificaciones de exones del RA	22
• Electroforesis en gel de agarosa	24
• Tratamiento de productos de PCR	24
• Secuenciación tipo Sanger	24
• Limpieza de la reacción de secuenciación	25
• Visualización de secuencias	26
• Análisis estadístico	26
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	46
LITERATURA CITADA	47
ANEXO	52

RESUMEN

Antecedentes. El crecimiento normal, el desarrollo y el mantenimiento de la próstata dependiente de andrógenos es mediado por un receptor afín, el receptor de andrógenos (RA, factor de transcripción nuclear), por lo que ha sido identificado como un contribuyente importante a la etiología y progresión del cáncer de próstata, así como a la respuesta inicial y posterior resistencia a las terapias endocrinas tales como la terapia de privación de andrógenos. El cáncer de próstata afecta en forma distinta a los grupos étnicos. En comparación con los varones blancos, los de raza negra tienen mayor número de neoplasias prostáticas, que son precursoras de cáncer y tumores más grandes. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados tienen como foco de atención a la población caucásica y afrodescendiente. Existen muy pocos estudios publicados referentes a la población hispana o latina; particularmente en México, no hay estudios sobre las mutaciones del RA en varones mexicanos ni como contribuyen estas mutaciones a la progresión y agresividad del CaP. **Objetivo.** Conocer los polimorfismos genéticos del RA de la población mexicana. **Material y métodos.** Se emplearon 49 biopsias prostáticas de mexicanos con diagnóstico histopatológico de CaP y 19 biopsias prostáticas de mexicanos negativas histopatológicamente para cáncer. Se extrajo el ADN genómico y mediante primers específicos se secuenciaron los 8 exones del receptor de andrógenos (AR). Además, para examinar el polimorfismo del número de repetidos CAG (codón que codifica para el aminoácido glutamina) en el exón 1 del AR en línea germinal, se analizó el ADN leucocitario total (obtenido de sangre periférica) de 14 mexicanos con diagnóstico histopatológico de CaP y de 10 mexicanos con niveles normales de antígeno prostático y sin síntomas relacionados a alguna patología prostática. **Resultados.** Se identificaron 4 mutaciones somáticas sin sentido y de sentido erróneo en el exón 1 del AR (W92X, L110M, L145V y V245V). Se observaron variaciones (expansión y/o disminución) en el número de codones CAG en comparación con el número reportado por la base de datos genética NCBI. En este trabajo el número de repetidos de CAG, en promedio, fue de 22.82 ± 1.62 en tejido prostático de pacientes con CaP y de 23.74 ± 2.85 en aquellos tejidos sin diagnóstico de CaP. Se encontraron algunas correlaciones positivas entre ciertas características clínicas y el número de repetidos de CAG (índice de masa corporal e hipertensión arterial), pero ninguna es estadísticamente significativa. **Conclusiones.** Se identificaron mutaciones somáticas que no habían sido reportadas en otros estudios; se encontró que el número de repetidos de CAG en la cohorte mexicana tiende a ser mayor a 22 y se sugiere como posible punto de corte para CaP un número de repetidos CAG ≤ 22 .

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Biosíntesis de andrógenos en el testículo	2
Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	3
Figura 3. Mecanismo de acción del RA	6
Figura 4. Estructura esquemática del RA: gen y proteína	7
Figura 5. Mapa de mutaciones del <i>AR</i> en cáncer prostático	10
Figura 6. Anatomía zonal de la próstata.	12
Figura 7. Diagrama de flujo de la amplificación y secuenciación de los exones del <i>AR</i>	23
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados, exones del <i>AR</i> [1(a, b,c) a 8]	31
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de la región b del exón 1 del <i>AR</i>	31
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la región c del exón 1 del <i>AR</i>	32
Figura 11. Distribución del número de repetidos de CAG en <i>AR</i> de la población de tejidos prostáticos (con y sin CaP).	34
Figura 12. Distribución del número de repetidos de CAG en el <i>AR</i> de tejido prostático de varones mexicanos con CaP.	35
Figura 13. Distribución del número de repetidos de CAG en el <i>AR</i> de tejido prostático de varones mexicanos sin diagnóstico de CaP.	36
Figura 14. Distribución del número de repetidos de CAG en <i>AR</i> , de acuerdo a la población con CaP y sin diagnóstico de CaP.	37
Figura 15. Comparación del número de repetidos de CAG (≤ 22 vs. > 22) entre la población con CaP y sin diagnóstico de CaP.	37
Figura 16. Distribución del número de repetidos de CAG en <i>AR</i> , entre casos y controles en línea germinal.	40
Figura 17. Distribución del número de repetidos de CAG en <i>AR</i> , entre tejido y línea germinal de pacientes con CaP.	41

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Estadios del cáncer de próstata	16
Tabla 2. Pares de primers específicos para el <i>AR</i> que flanquean los límites de intrón-exón	23
Tabla 3. Reactivos y volúmenes requeridos para la preparación de la mezcla maestra de reacción para cada exón	23
Tabla 4. Condiciones del termociclador	24
Tabla 5. Limpieza enzimática de productos de PCR	25
Tabla 6. Reactivos y volúmenes requeridos para la mezcla de marcaje de los productos de PCR	25
Tabla 7. Condiciones del termociclador	26
Tabla 8. Características clínicas de la población de estudio	30
Tabla 9. Mutaciones y polimorfismos en el <i>AR</i> del tejido prostático de varones mexicanos con CaP	33
Tabla 10. Repetidos de CAG en el <i>AR</i> de acuerdo a las características clínicas de la población con CaP	39

Listado de abreviaturas

AR	<i>Receptor de Andr6genos</i> , gen
AF1	Funci3n de activaci3n 1
APE	Ant6geno prost3tico espec6fico
CaP	C3ncer de pr3stata
DBD	Dominio de uni3n al ADN
DHT	Dihidrotestosterona
DHEA	Deshidroepiandrosterona
ERA	Elementos de respuesta a andr6genos
FSH	Hormona estimulante del f3liculo
GnRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
HTA	Hipertensi3n arterial
IMC	6ndice de masa corporal
LH	Hormona Luteinizante
NDT	Dominio amino terminal
LBD	Dominio de uni3n al ligando
RA	Receptor de andr6genos, prote6ina

ANDRÓGENOS

Las hormonas sexuales masculinas son conocidas como andrógenos, y su nombre deriva del griego *andros* que significa hombre, y *genos* que significa producir. Los andrógenos son los responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad. En la edad adulta, los andrógenos son esenciales para el mantenimiento de la función reproductiva masculina y el comportamiento. Además de sus efectos sobre la reproducción, los andrógenos afectan a una amplia variedad de tejidos no reproductivos incluyendo piel, hueso, músculo y tejidos adiposos. Como consecuencia, la desregulación en la producción o acción de los andrógenos puede afectar a diferentes sistemas de órganos con un grado variable de gravedad. Esto se refleja en patologías que van desde los síndromes de insensibilidad a los andrógenos y el cáncer de próstata hasta un mayor riesgo y susceptibilidad a enfermedades relacionadas con el género, como los carcinomas hepatocelulares, a condiciones relativamente suaves como el acné y la alopecia masculina [1].

Del 90 al 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo, siendo los más importantes la testosterona, la dihidrotestosterona y la androstenediona. De estas tres hormonas la testosterona se sintetiza en mayor concentración, por lo que es considerada como el principal andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona presente en el plasma de varones sanos [1,2].

Acciones de los andrógenos

El principal andrógeno circulante en el hombre es la testosterona, pero es la dihidrotestosterona (DHT), su metabolito más activo, la que participa en varios procesos biológicos, dentro de los que se incluyen el desarrollo normal del pene, del escroto, de los testículos, de las glándulas sexuales accesorias y de la presencia de las características sexuales secundarias en la pubertad [2,4,5].

Durante la niñez y la edad prepuberal, la secreción y la acción androgénicas son mínimas. En la pubertad, la secreción de testosterona aumenta de nuevo y provoca el desarrollo completo de los órganos genitales masculinos, estimulando su función: favorecer la espermatogénesis en conjunción con la hormona estimulante del folículo (FSH), estimulación del desarrollo y la secreción de la próstata y las vesículas seminales, estimulación de la libido y la erección. Al mismo tiempo, favorece la aparición de los caracteres sexuales secundarios, como la disposición del vello y de pelo en el cuerpo y la

modificación de la voz. Estimula el crecimiento óseo (produce proliferación de los condrocitos en los cartílagos de crecimiento, pero, para que se produzca el cierre de las epífisis y una adecuada masa ósea, es necesaria la aromatización de la testosterona, es decir, que se convierta en estradiol) y el desarrollo muscular, así como el crecimiento y la secreción de las glándulas sebáceas en las que se pueden formar tapones que favorecen la infección y la aparición de acné [4].

La testosterona actúa en otros órganos no relacionados con la actividad reproductora, como el riñón, el hígado y el músculo, previa interacción con receptores androgénicos. Además de su acción trófica, la testosterona modifica el patrón de síntesis de enzimas metabolizantes en el hígado y estimula la síntesis de eritropoyetina en el riñón [3].

Acción anabolizante. En el músculo, la acción de la testosterona sobre sus receptores se expresa en forma de un incremento del desarrollo muscular, lo que explica la diferencia morfológica entre los sexos. Los andrógenos provocan retención de nitrógeno y otros iones (sodio, potasio, cloro, fósforo y azufre), si bien el efecto es pasajero. Esta acción anabolizante puede ser diferenciada de la acción virilizante; cuanto mayor sea el índice que relaciona ambas actividades, mayor será la capacidad de un andrógeno para promover la acción anabolizante sin que se aprecien signos de virilización. Pero no hay ningún andrógeno que carezca por completo de cierta actividad virilizante [4,5].

Síntesis de andrógenos

El precursor de las hormonas gonadales es el colesterol. Las células de Leydig obtienen el colesterol del plasma, a partir de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LBD). Las LBD atraviesan la membrana plasmática por endocitosis mediada por receptor. El colesterol es transformado en pregnenolona en la mitocondria, por lo que el colesterol, unido a una proteína transportadora de esteroides (SCP2), debe transportarse e internalizarse en esta estructura. Cuando el colesterol es convertido en pregnenolona, esta última es liberada de la mitocondria y se transporta al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis [1,2].

La síntesis de andrógenos se lleva a cabo a través de dos rutas metabólicas: a partir de 17-hidroxi pregnenolona (ruta $\Delta 5$) o a partir de 17-hidroxi-progesterona (ruta $\Delta 4$). En las células de Leydig, la síntesis sigue la vía $\Delta 5$: la pregnenolona se convierte en 17- α -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenodiol y testosterona [1-4]. En la

Figura 1 se muestra un esquema representativo del metabolismo de esteroides en el testículo.

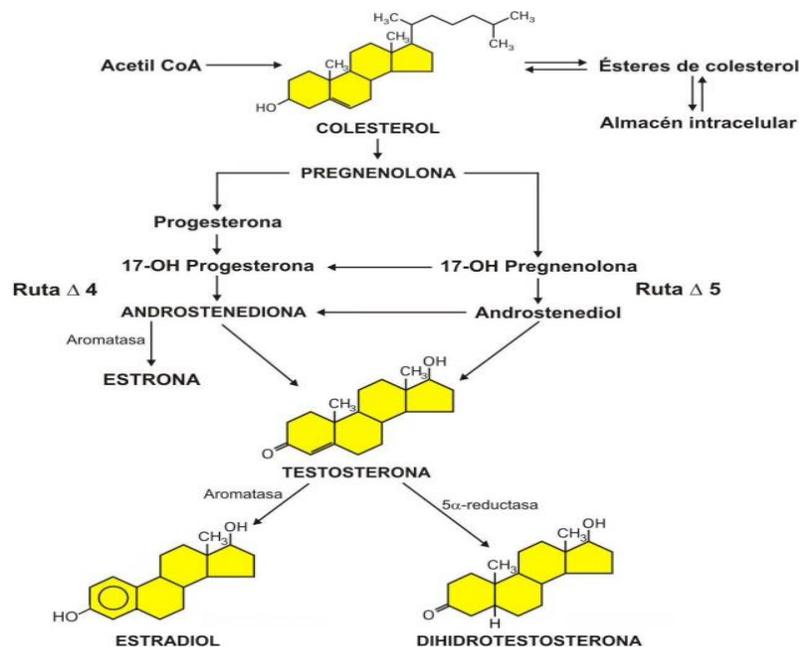


Figura 1. Biosíntesis de andrógenos en el testículo. La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta Δ5) o a partir de la 17-hidroxi progesterona (ruta Δ4). Adaptado de Rojas-Durán, 2011.

La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (GnRH, liberada del hipotálamo), estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, la cual posteriormente estimula a las células de Leydig para inducir la síntesis de testosterona. La síntesis de testosterona es regulada por una retroalimentación negativa para prevenir la liberación de la GnRH y, en consecuencia, decrecer la sensibilidad de la adenohipófisis a la GnRH (ver Figura 2) [1,2].

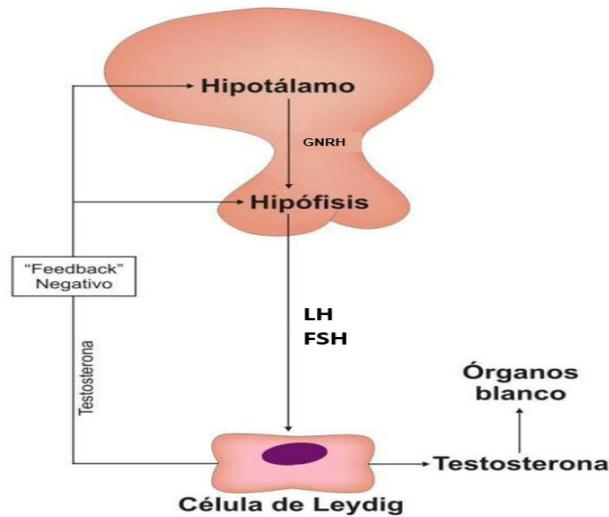


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Adaptado de Rojas-Durán,2011.

Ya liberada, la testosterona pasa a la circulación sanguínea unida a la albúmina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), o también en forma libre, para alcanzar sus órganos blanco y ejercer sus efectos. Como ya se mencionó, uno de los órganos blanco destacado en donde la testosterona ejerce un papel importante en su desarrollo y crecimiento es la próstata. En esta glándula la testosterona es convertida, por medio de la 5-alfa-reductasa, a una hormona mucho más potente, la DHT (dihidrotestosterona).

Los andrógenos son sintetizados también en otros órganos, como ovario, corteza suprarrenal y placenta, en la forma de precursores que posteriormente se convierten en andrógenos activos en los tejidos periféricos: hígado, piel y tejido adiposo. En la corteza suprarrenal, los proandrógenos son la deshidroepiandrosterona (DHEA) y la androstenediona [4].

El testículo produce diariamente 2,5-10 mg de testosterona en el hombre adulto, originando unos niveles plasmáticos de 350-1.000 ng/dl, que fluctúan de forma circadiana. En el adulto castrado, los niveles son de 45 ng/dl, en los varones impúberes, 6-7 ng/dl; en mujeres, los andrógenos producidos por el ovario y las suprarrenales alcanzan 0,25 mg, siendo los niveles plasmáticos de 15-65 ng/dl. Los principales andrógenos en las mujeres incluyen sulfato de DHEA, DHEA, androstenediona, testosterona y DHT [3,4].

La DHT es más potente que la testosterona, su actividad biológica supera a la de testosterona hasta 10 veces, pero su concentración plasmática es muy baja: 35-75 ng/dl [1,2].

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA)

Los efectos biológicos de los andrógenos (testosterona o DHT) son mediados a través de la unión a un receptor afín, el receptor de andrógenos (NR3C4; receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, gen 4, HGNC *AR*). Este es un miembro de la superfamilia de los 48 receptores nucleares conocidos hasta ahora que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando [5-7]. La familia de receptores nucleares incluye receptores para hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, ácido retinoico, 1,25 dihidroxivitamina D, ecdisona y receptores activados por proliferador de peroxisoma. El análisis estructural y funcional comparativo de los receptores hormonales nucleares ha revelado una organización estructural común en cuatro dominios funcionales diferentes [5].

El modelo actual para la acción de andrógenos implica un mecanismo de varios pasos. En el citoplasma, los monómeros del RA están inactivos debido a que están unidos a proteínas llamadas chaperonas, como las Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56, p23, TPR. Estas chaperonas “secuestran” al RA e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional, pero también inducen una conformación de alta afinidad para el ligando. Cuando la DHT o la testosterona se unen al RA, este sufre un cambio conformacional y las chaperonas se disocian; entonces el RA es fosforilado, forma que induce la translocación al núcleo. En el núcleo, el RA se dimeriza y se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERAs) para activar la transcripción y la posterior síntesis de proteína implicadas, por ejemplo, en estimular el desarrollo y mantener el tamaño y función secretora de la próstata [1,2,5]. Cabe destacar que la DHT se une al RA con mayor afinidad que la testosterona, el complejo DHT-RA es más estable que el complejo testosterona-RA, persistiendo en las células por más tiempo [1,3,5]. En la Figura 3 se muestra el esquema representativo del mecanismo de acción del RA

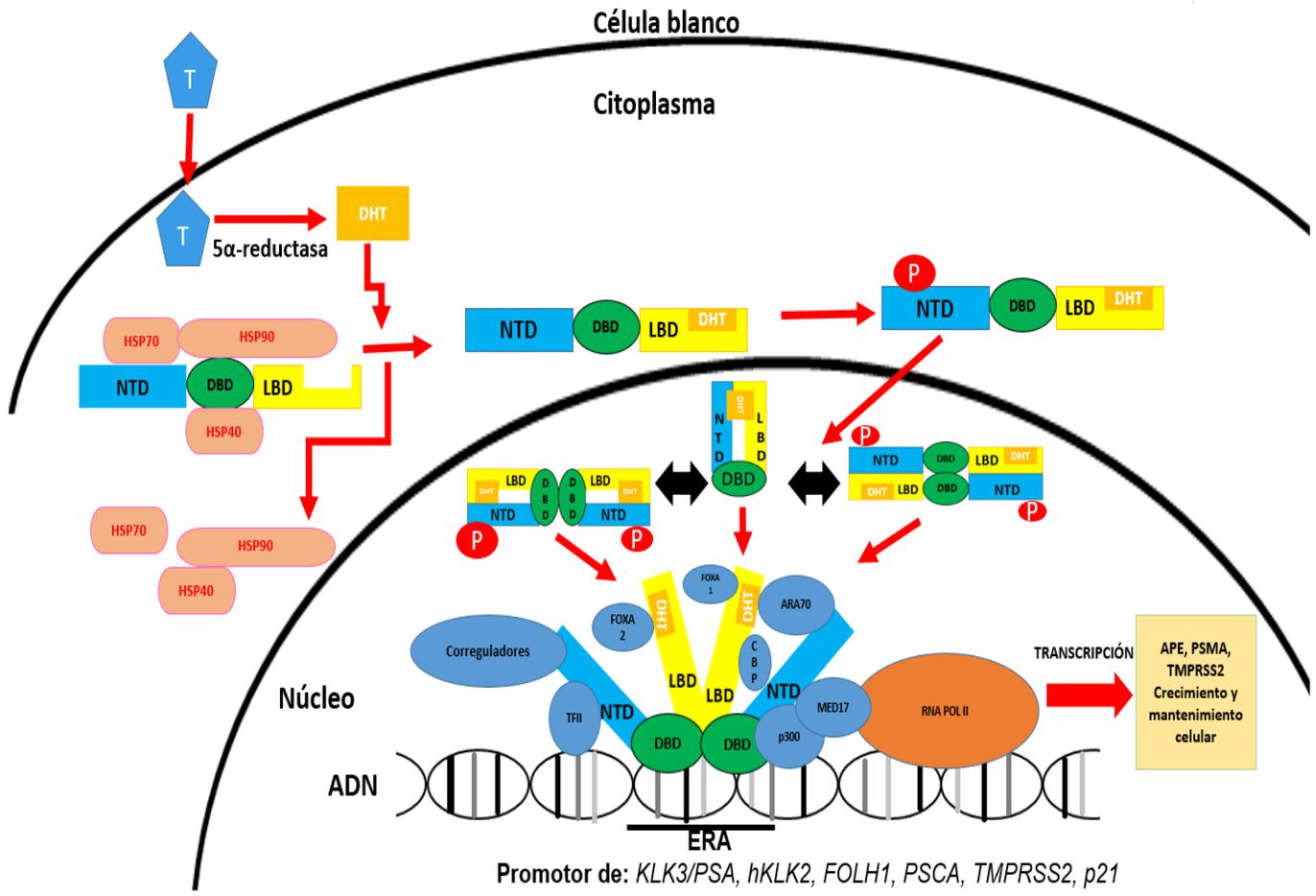


Figura 3. Mecanismo de acción del RA. Los dominios estructurales del receptor de andrógenos (RA) están etiquetados como: NTD (dominio amino terminal), DBD (unión al ADN) y LBD (dominio de unión al ligando). La testosterona (T) ingresa a la célula blanco donde la enzima 5α-reductasa la transforma en dihidrotestosterona (DHT). La DHT interactúa con el receptor de andrógenos para facilitar la liberación de las proteínas de choque térmico (HSP), el RA es entonces fosforilado induciendo la translocación al núcleo por medio de la importina α. Dentro del núcleo, el RA se encuentra en equilibrio entre sus formas monoméricas y dimericas. Aunque no está claro qué forma (s) es necesaria para la unión al ADN, el RA existe como un dímero cuando está unido a los elementos de respuesta a andrógenos (ERAs). La unión al ADN permite el reclutamiento de factores de inicio de la transcripción (TFII) y de otros correguladores, tales como la proteína de unión a CREB (CBP), los activadores de la transcripción p300, Fox A 1, Fox A 2 y MED17, y la proteína ARA70 asociada al RA. La ARN polimerasa II (RNA POL II) puede entonces transcribir genes dependientes del RA.

Organización estructural y función del RA

El gen *AR* está localizado en el cromosoma X en la posición Xq11-12, y consta aproximadamente de 180 kb de largo. Está formado de ocho exones separados por

intrones, algunos de los cuales albergan exones crípticos [9,10]. El gen *AR* expresa un mRNA maduro de 10.6 kb que contiene un marco de lectura abierto (ORF) de 2757 bases que codifica para un polipéptido de 110 kDa. La proteína codificada tiene aproximadamente 919 aminoácidos [1,5,8,10].

Al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, el RA se caracteriza por una estructura modular que consta de cuatro dominios funcionales: un dominio amino-terminal (NTD), un dominio de unión al ADN (DBD), una región bisagra y un dominio de unión al ligando (LBD) [10]. En la Figura 4 se muestra una representación esquemática del RA.

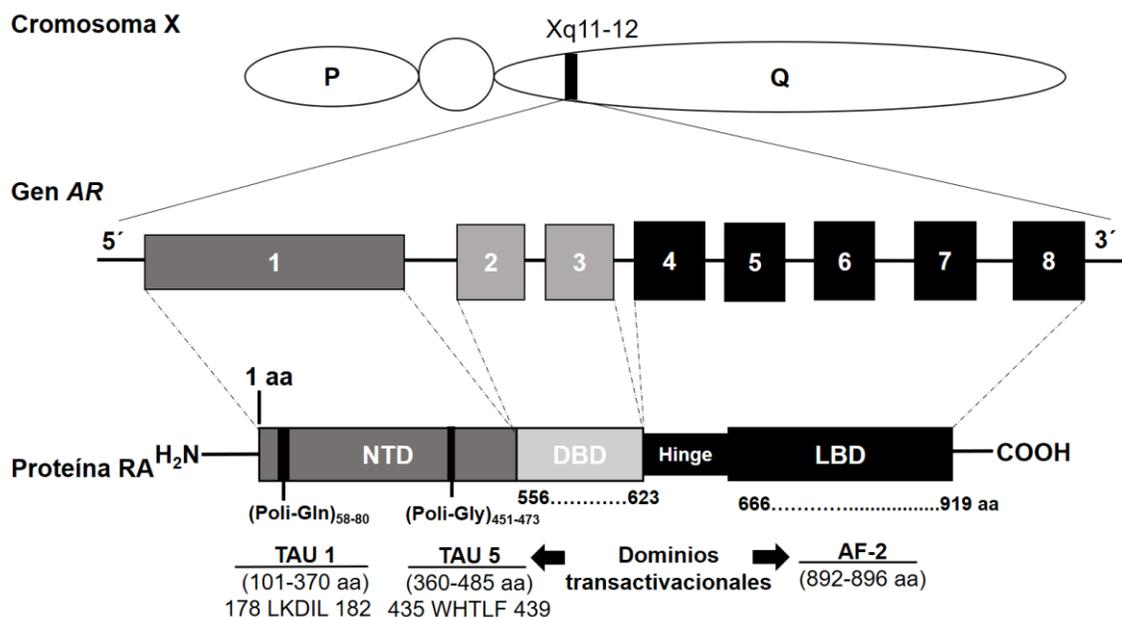


Figura 4. Estructura esquemática del RA, gen y proteína. El *AR* está localizado en el cromosoma X en la posición Xq11-12. Está formado de 8 exones que codifican para cuatro dominios: Dominio N-Terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD), la región bisagra y el dominio de unión a ligando (LBD). Adaptado de Koochekpour, 2010.

El exón 1 del *AR* codifica en su totalidad al NTD, representa casi el 60% de la proteína, y es el menos conservado de los cuatro dominios. Esta variabilidad le permite reclutar diferencialmente co-reguladores que confieren una transactivación específica de andrógenos, por ejemplo, BRCA1 interactúa con el NTD del RA mejorando la transcripción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 [7,11].

El NTD alberga las principales funciones de activación de la transcripción y varios subdominios estructurales. Contiene la región llamada función de activación 1 (AF1) a través de la cual la actividad transactivacional del RA es mediada predominantemente, así como la interacción con co-reguladores. Esta región consta de dos unidades de activación independiente: TAU 1 (localizada entre los residuos 101 y 370) y TAU 5 (localizada entre los residuos 360 y 485). Dentro de las unidades TAU1 y TAU5 hay dos motivos centrales, LKDIL y WHTLF, que han sido identificados como reguladores de la actividad del RA andrógeno-dependiente y andrógeno independiente, respectivamente [1,5,7,10,12,13]. También existe un motivo Phe-Glu-Asn-Leu-Phe (FQNLF, localizada entre los residuos 23 y 27) que media la interacción del NTD con el carboxilo terminal del LBD para estabilizar la unión de los andrógenos u otras moléculas [7].

El exón 1 también presenta varias regiones de secuencias de ADN altamente repetitivas (CAG y GNN) que codifican poliglutamina y poliglicina polimórficas. El acortamiento en el número de repetidos de glutamina se ha correlacionado con el riesgo de cáncer de próstata y se ha demostrado que alteraciones en el número de repeticiones de este aminoácido afectan la interacción del NTD con el carboxilo terminal del LBD [1,5].

El DBD es codificado por los exones 2 y 3 del AR, está localizado en la parte central de la molécula del RA, es la región más conservada dentro de la familia de los receptores nucleares y es la que reconoce y se une a los ERA. Al igual que otros receptores nucleares, la región DBD del RA contiene nueve cisteínas, de los cuales ocho están vinculados a dos iones de zinc, y a través de grupos sulfidrido éstos se organizan en dos dominios de dedos de zinc. La especificidad del reconocimiento del ADN por el RA se determina por el primer dedo de zinc y la estabilización del complejo de ADN-receptor, y la dimerización del receptor se determina por el segundo dedo de zinc [1,5,10]. Algunos de los principales genes blanco regulados transcripcionalmente por el AR incluyen al *KLK3/PSA*, que codifica al antígeno prostático específico (APE), *hKLK2* (codifica a la calicreína humana tipo 2), *hKLK4* (codifica a la peptidasa relacionada con la calicreína 4), *FOLH1* (codifica al antígeno prostático específico de membrana, PSMA), *PSCA* (codifica al antígeno de células madre de próstata), *p27* (regulador del ciclo celular), *VEGF* (codifica al factor de crecimiento endotelial vascular), *TMPRSS2* (codifica al receptor transmembranal con actividad serin proteasa 2), *Nkx3.1* (codifica un factor de transcripción), *FKBP51* (codifica una inmunofilina), *UBE2C* (codifica a una ubiquitina), *p21* (codifica a un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina) y *KGF* (codifica al factor de crecimiento fibroblástico 7) [12,14].

Entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando, se localiza una región bisagra no conservada, que también es de tamaño variable en diferentes receptores esteroideos. La región bisagra puede considerarse como un enlazador flexible entre el dominio de unión al ligando y el resto de la molécula receptora. La región bisagra es importante para la localización nuclear y contiene una señal bipartita de localización nuclear. En algunos receptores nucleares, incluyendo el AR, la acetilación puede ocurrir en la región bisagra en el sitio consenso de acetilación altamente conservado KLLKK [1,5,7,10].

Finalmente, el LBD es codificado por los exones 4 a 8 del gen *AR*. Estructuralmente este dominio es similar al de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Consta de 12 alfa-hélices. El carboxilo terminal de la alfa hélice 12 adquiere una conformación tal que da como resultado una estructura globular hidrofóbica que permite la interacción con proteínas co-activadoras, región que es llamada AF2. AF2 es por tanto la principal superficie de interacción proteína-proteína utilizada por los receptores nucleares para reclutar co-activadores que contienen el motivo LXXLL. Sin embargo, el RA difiere de otros receptores nucleares en este sentido ya que interactúa con co-activadores de una manera única. La estructura globular hidrofóbica en el LBD del AR se une preferentemente a los motivos FXXLF, incluyendo el motivo FQNLF en su NTD, e interactúa mal con los motivos LXXLL que se encuentran comúnmente en los co-activadores [1,5,7,10].

Interacción del RA con otras proteínas

En general, las proteínas que interactúan con el RA se pueden dividir en tres clases:

- 1) Componentes de la maquinaria transcripcional [8].
- 2) Proteínas funcionalmente diversas con propiedades de coactivación o de correpresión. La lista de proteínas que han sido clasificadas como potenciales corre reguladores de AR contiene 170 miembros [1]. Estos corre reguladores tiene una amplia gama de funciones y están involucrados en múltiples vías celulares por lo que se han clasificado en: componentes del complejo de remodelación de la cromatina, modificadores de las histonas como las acetil transferasas y desacetilasas, las metiltransferasas o las desmetilasas, los componentes de la ubiquitinación, las proteínas implicadas en la endocitosis, el sistema de reparación del ADN, el empalme y metabolismo del ARN, chaperones y co chaperones, proteínas citoesqueléticas, integradores de señales, transductores de señales, andamios, reguladores de ciclo celular y reguladores apoptóticos [1,8].

Las mutaciones de ganancia de función modifican las características del RA, permitiéndole que sea activado por concentraciones bajas de andrógenos o cambiando su especificidad, haciéndolo sensible a otro tipo de esteroides, más que a la propia DHT, como por ejemplo la progesterona, el estradiol, los andrógenos adrenales, la cortisona y los anti-andrógenos no esteroidales (flutamida, nilutamida). Esta multifuncionalidad del RA usualmente resulta de mutaciones puntuales en el dominio LBD del gen del RA, que originan un decremento en la especificidad de unión al ligando y permite la activación de los genes que son regulados por el RA aun en un ambiente donde ya no hay andrógenos [1,2,7].

Rol del RA en el cáncer de próstata

El crecimiento normal, el desarrollo y el mantenimiento de la próstata dependiente de andrógenos es mediado por el RA, por lo que ha sido identificado como un contribuyente importante a la etiología y progresión del cáncer de próstata, así como a la respuesta inicial y posterior resistencia a las terapias endocrinas tales como la terapia de privación de andrógenos (ADT) [16].

Las alteraciones genéticas del RA se han propuesto como mecanismo para la progresión del CaP y su metástasis, principalmente a hueso. Estas alteraciones incluyen: (1) la amplificación o sobreexpresión genómica de AR, (2) Mutaciones puntuales con ganancia o pérdida de la función (3) Variantes constitutivamente activas del RA y (4) Repeticiones cortas de CAG [1,2,8].

En lo referente a las mutaciones de ganancia de función del RA en el CaP, éstas se detectan en diferentes dominios funcionales y rara vez en las regiones del gen 5' y 3' no traducidas (UTRs). La mayoría de estas mutaciones son sustituciones de una sola base que directa o indirectamente afectan a la función de RA. Alrededor del 51% de las mutaciones de sustitución se encuentran en el LBD, el 41% en la NTD, y el 7% en el DBD (Figura 5) [6,8,17].

CÁNCER DE PRÓSTATA

Anatomía y fisiología de la próstata

La próstata es un órgano que está presente solo en el varón, impar, con forma de nuez y está situada en la pelvis, debajo de la vejiga, delante del recto y rodea una parte de la uretra. Es la única glándula sexual accesoria presente en todos los mamíferos [18]. Su función principal es la secreción del líquido prostático que se convierte en parte del semen junto con las secreciones de las vesículas seminales, glándulas de Cowper y Littre. Las células epiteliales de la próstata producen antígeno prostático específico (APE, una serina proteasa relacionada con la calicreína que ocasiona licuefacción del coágulo seminal) y fosfatasa ácida prostática (PAP). Tanto las células epiteliales como las células del estroma expresan receptores de andrógenos y dependen de estas hormonas para su proliferación [18-20]. La testosterona producida fundamentalmente en el testículo (90-95 por ciento) y en un 5 por ciento a nivel renal, actúa sobre los receptores androgénicos de las células epiteliales y estromales prostáticas [1]. Otras funciones menos relevantes de la próstata son servir de sostén a la base vesical, aportar resistencia a la uretra en el papel de la continencia en la micción y participar en la fase de emisión de la eyaculación al contraer su musculatura lisa y vaciar su secreción en la uretra.

Fundamentalmente se distinguen cuatro zonas de la glándula: la zona Anterior, de constitución fibromuscular y sin estructuras glandulares, 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 (Figura 6) [18].

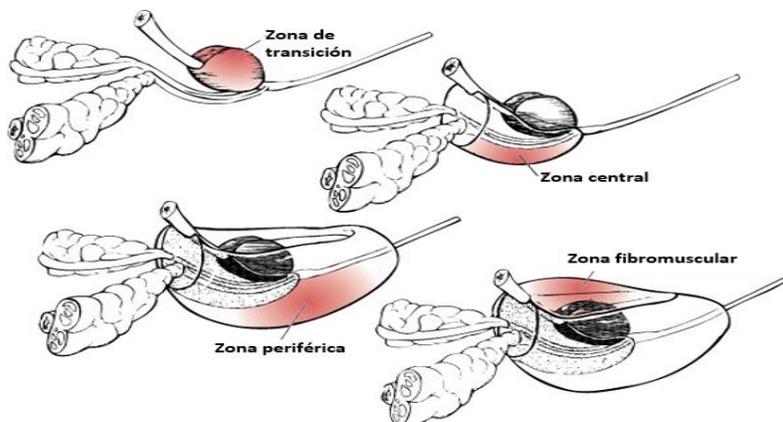


Figura 6. Anatomía zonal de la próstata. Adaptado de Kufe D.W, 2003.

La próstata es muy pequeña durante la infancia, estimándose su peso hasta los 10 años de edad sobre 1,4 gramos. Durante la pubertad se produce una hiperplasia del epitelio ductal, llegando a pesar la glándula entre 10 y 14 gramos a los 20 años. Entre los 35 a 40 años consigue su desarrollo final a expensas del componente glandular, alcanzando para entonces un peso medio de unos 20 gramos. A partir de esta edad comienza a desarrollarse una involución prostática a la vez que puede aparecer una hiperplasia benigna de la próstata alrededor de la uretra prostática (zona transicional) o en la zona central (lóbulo medio prostático) [1].

Enfermedades más frecuentes

Las enfermedades más frecuentes de la próstata son:

Prostatitis. Es una inflamación de la próstata. Puede ser infecciosa o no. Puede producir síntomas de infección urinaria, pero con urocultivos negativos. Las prostatitis agudas pueden ser causadas por enfermedades de transmisión sexual. A menudo dan muchos síntomas e incluso fiebre. Las prostatitis crónicas suelen asentarse en las próstatas grandes, de personas de más de 50 años con hipertrofia prostática benigna. Los síntomas pasan generalmente desapercibidos. El tratamiento antibiótico suele tardar semanas en las prostatitis [18-20].

Hiperplasia benigna de próstata, Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) o adenoma prostático. No se trata de cáncer, sino de crecimiento del órgano (al contrario que la mayoría, que tienden a atrofiarse con la edad) hasta llegar a hipertrofiarse. Son cambios normales que sufre la próstata en los varones a medida que envejecen. Puede causar síntomas de irritación de la vejiga, como urgencia para orinar, menor fuerza en el chorro de orina, u orinar repetidas veces; esto se denomina prostatismo. Posee diferentes complicaciones, tales como infecciones urinarias a repetición, retención urinaria completa, insuficiencia renal, hematuria y litiasis vesical [18-20].

Cáncer de próstata. Es muy común en los varones. Su presencia se corrobora mediante una biopsia de próstata.

Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una de las principales causas de muerte en varones por cáncer en todo el mundo. Ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerígenas y es el segundo más común entre la población masculina, después del cáncer de pulmón [21]. Se estima que afecta a uno de cada siete varones, aunque su frecuencia se eleva conforme se avanza en edad, de manera que, a partir de los 65 años, seis de cada 10 varones lo presentan.

En México, ocupa el primer lugar de incidencia (27.3 por 100 000 habitantes) y de mortalidad (11.3 por 100 000 habitantes) entre la población masculina [21]. Las entidades con mayor número de casos reportados son: Michoacán, Jalisco, Ciudad de México, Veracruz, Estado de México, Durango y Guanajuato [22].

Detección

El diagnóstico se establece a través de estudios clínicos y de gabinete: tacto rectal, ultrasonografía, tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética nuclear (RMN), y marcadores séricos; entre estos, sin duda el más importante es el antígeno prostático específico, el cual se produce en las células epiteliales malignas y no malignas, por lo que es específico de la próstata, no del cáncer prostático [23].

El APE es una glicoproteína secretada por las células epiteliales prostáticas, que tiene una actividad lítica sobre el coágulo eyaculatorio, para promover la motilidad espermática. El APE penetra la circulación sanguínea y puede ser medido.

El APE, se determina como normal si es menor a 4 ng/mL, intermedio, 4.1-10 ng/mL y altamente sospechoso arriba de 10 ng/mL. Aunque, las concentraciones séricas también pueden incrementarse en caso de prostatitis (inflamación de la próstata), infección de las vías urinarias e hiperplasia prostática benigna [20,23]. Es importante tomar en cuenta las posibilidades de tener un CaP con niveles bajo de APE, aun con un nivel menor a 1ng/mL se ha reportado que el riesgo de CaP es del 10.1% [24].

La biopsia de próstata se considera como "el estándar de oro" para confirmar el diagnóstico de cáncer, pero generalmente se realiza luego de constatar anormalidades en el tacto rectal o elevación del APE. Las muestras pueden obtenerse insertando una aguja a través del recto, el perineo o la uretra. Cada punción de biopsia se explora en busca de cáncer y se cuantifica la cantidad de tejido neoplásico a partir de la longitud del tumor dentro

del fragmento cilíndrico y el porcentaje afectado del mismo. Cuando se diagnostica cáncer de próstata, se asigna un índice de su malignidad histológica por medio del sistema de gradación de Gleason [20,25]. Este sistema está basado en la observación, en el microscopio, por parte del experto en histopatología, que analiza y reporta las características de la biopsia del tumor. Usualmente se seleccionan dos zonas de la muestra para asignar a cada una de ellas un número del 1 al 5. El 1 corresponde a un tumor bien diferenciado, y poco agresivo, mientras que el 5 a un tumor escasamente diferenciado. Los valores comprendidos entre el 2 y el 4 se asignan a grados de diferenciación intermedia. En la suma de cifras obtenidas en las dos zonas se basa el promedio que determina el puntaje entre el 2 y el 10. Ese valor es la escala de Gleason [25]. Los resultados posibles son:

Escala de Gleason entre 2 y 6: Cáncer con escasa agresividad, crecimiento lento, y por lo tanto de mejor pronóstico.

Escala de Gleason de 7: Cáncer con agresividad intermedia.

Escala de Gleason entre 8 y 10: Cáncer de alta agresividad, y peor pronóstico.

También se identifica y registra la presencia o ausencia de invasión perineural y propagación extracapsular [20].

En términos de anatomía 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.

Los médicos utilizan la estadificación para evaluar la extensión del cáncer y el pronóstico del paciente. Suele utilizarse el sistema de estadificación TNM, que tiene en cuenta la combinación de T (tamaño del tumor e invasión de los tejidos cercanos), N (implicación de los ganglios linfáticos) y M (metástasis o difusión del cáncer a otros órganos del cuerpo) para clasificar el cáncer en uno de los estadios que se indican a continuación. Conocer el estadio es fundamental para tomar la decisión correcta de tratamiento. Cuanto más alto es el estadio, peor es el pronóstico [25]. La tabla que se muestra a continuación presenta los diferentes estadios del cáncer de próstata [19-20].

Tabla 1. Estadios del cáncer de próstata.

Estadio	Definición
Estadio I	El tumor únicamente afecta a un lóbulo de la próstata (que tiene dos). Puede encontrarse de forma incidental por una biopsia posterior a la determinación de una alta concentración de PSA. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo.
Estadio II	El tumor se ha expandido al otro lóbulo y puede afectar a toda la próstata sin salir de la cápsula que la rodea. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo.
Estadio III	El tumor se ha extendido fuera de la próstata hasta las vesículas seminales, un par de glándulas situadas por encima de la próstata que secretan una importante proporción del líquido que contiene el semen. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a ninguna otra parte del cuerpo, a excepción de las vesículas seminales.
Estadio IV	El tumor ha invadido las estructuras adyacentes, además de las vesículas seminales, por ejemplo: el recto, los músculos o la pared de la pelvis o, independientemente de la invasión de las estructuras adyacentes, se ha extendido a otras partes del cuerpo, incluyendo ganglios linfáticos y huesos.

Tratamiento

Hay diferentes tipos de tratamientos para los pacientes de cáncer de próstata, los cuales dependen del estadio en el cual se encuentre el paciente [20,25]. En general, se utilizan cuatro tipos de tratamiento estándar:

Vigilancia activa. Vigilar la enfermedad a intervalos fijos mediante tacto rectal, medición de APE y biopsias prostáticas repetidas, hasta que los cambios histopatológicos o serológicos indicativos ameriten tratamiento con intención curativa.

Cirugía. Se recomienda para pacientes con una esperanza de vida de 10 años o más y cuyo tumor está en la glándula prostática. Se utilizan los siguientes tipos de cirugía:

Prostactectomía radical: procedimiento quirúrgico para extirpar la próstata, el tejido circundante y las vesículas seminales. Se realiza por vía retro púbica o perineal.

Linfadenectomía pélvica: cirugía para extirpar los ganglios linfáticos de la pelvis.

Radioterapia. Se aplica por medio de un haz externo o por la implantación de elementos radiactivos (semillas, también llamada braquiterapia) en la glándula o por una combinación de estas técnicas. La dosis de radiación es importante; se recomienda un mínimo de 75.6 a 79 u 80 Gy. La forma de administración de la radioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando. Los varones que se tratan con radioterapia para el cáncer de próstata tienen mayor riesgo de cáncer de vejiga o gastrointestinal. La radioterapia puede producir impotencia y problemas urinarios.

Terapia hormonal. El uso de la terapia hormonal para tratar el cáncer se basa en la observación de que en la superficie de algunas células tumorales se encuentran receptores de hormonas específicas necesarias para el crecimiento celular. La terapia hormonal puede funcionar haciendo que se detenga la producción de una determinada hormona, bloqueando los receptores de la hormona o sustituyendo a la hormona activa con agentes químicamente similares que no pueden ser utilizados por la célula tumoral. Los diferentes tipos de terapia hormonal se clasifican de acuerdo a su función y/o tipo de hormona sobre la que actúan. En el cáncer de próstata se impide la acción de la testosterona o se reduce su concentración. Los tratamientos médicos que disminuyen las concentraciones de testosterona incluyen:

Agonistas/Antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Gonadotropina, GnRH): La hormona luteinizante (LH o HL) u hormona luteoestimulante o lutropina es producida por el lóbulo anterior de la hipófisis o glándula pituitaria. En el hombre es la hormona que regula la secreción de testosterona, actuando sobre las células de Leydig en los testículos; y en la mujer controla la maduración de los folículos, la ovulación, la iniciación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. La liberación de LH de la glándula hipófisis es regulada por la producción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo. Estos impulsos a su vez, están sujetos a la retroalimentación del andrógeno proveniente de las gónadas (Figura 2). En el comienzo los análogos de la GnRH producen un aumento de la hormona luteinizante y de la hormona estimulante de los folículos, seguido de una disminución del número de receptores en la hipófisis, con lo que se logra castración química. Por tanto, pueden detener la producción de testosterona de los testículos [4,20]. Algunos ejemplos son la leuprolida, la goserelina y la buserelina.

Antiandrógenos: no permiten la acción de los andrógenos, como la testosterona, impidiendo su unión con el receptor de andrógenos [3]. Por ejemplo, la flutamida, la bicalutamida, la enzalutamida y la nilutamida.

Inhibidores de esteroides adrenales: Los principales andrógenos sintetizados por la corteza adrenal son: dehidroepiandrosterona (DHEA), su sulfato (DHEAS) y androstenodiona. En realidad, no tienen actividad androgénica per se, pero pueden convertirse en andrógenos muy activos como testosterona y 5- α -dihidrotestosterona (DHT) en los tejidos periféricos. La hormona adrenocorticotropa (ACTH) estimula la secreción androgénica [3-4]. Los medicamentos que pueden evitar que las glándulas suprarrenales elaboren andrógenos incluyen el ketoconazol y la aminoglutetimida.

Orquiectomía: procedimiento quirúrgico para extirpar uno o ambos testículos, la principal fuente de testosterona, a fin de disminuir la cantidad de hormona que se produce [3-4].

Estrógenos: pueden impedir que los testículos elaboren testosterona. Sin embargo, los estrógenos rara vez se utilizan en el tratamiento del cáncer de próstata debido al riesgo de efectos secundarios graves [3-4].

Factores de riesgo

Los cuatro factores de riesgo más importantes reconocidos para el cáncer de próstata son:

Edad. El cáncer de próstata raramente se presenta en varones menores de 40 años de edad, y el riesgo de incidencia se incrementa rápidamente con cada década transcurrida. Siendo los varones mayores de 65 años los más afectados.

Historia familiar. Estudios epidemiológicos indican que el riesgo de diagnosticar cáncer de próstata aumenta un factor de dos tantos si un pariente de primer grado lo tuvo, y cuatro tantos si hubo dos parientes o más afectados. Se estima que del 5 a 10% de las neoplasias malignas de próstata tienen un componente genético hereditario.

Raza/ Grupo étnico. El cáncer de próstata afecta en forma distinta a los grupos étnicos. En comparación con los varones blancos, los de raza negra tienen mayor número de neoplasias prostáticas, que son precursoras de cáncer y tumores más grandes. En 2013 en los Estados Unidos, el 37% de todos los cánceres de próstata, se presentaron en varones afro-americanos (AA). Los varones AA tienen de 1.6 a 1.9 veces una incidencia más alta y de 2 a 3 veces una mayor mortalidad en comparación con los caucásicos- americanos. Los varones AA con cáncer de próstata presentan un tumor más grande, un estadio más avanzado de la enfermedad, un grado de Gleason más alto y una concentración de APE más elevada. En general, los varones AA tienen un pronóstico peor que su contraparte caucásica [8].

Estudios epidemiológicos también han reportado que el riesgo de desarrollar y morir de cáncer de próstata es más bajo entre los japoneses. No existen estudios epidemiológicos o datos reportados respecto a la población latina, en particular no hay información referente a la población mexicana.

Alteraciones o variaciones en genes clave. Múltiples estudios han asociado las variaciones en la incidencia del cáncer de próstata con alteraciones o variantes polimórficas del gen de receptor de andrógenos, el gen del citocromo P450 C17, y el gen de la reductasa 5 α de esteroide tipo II (SRD5A2). Siendo el RA el más estudiado y el que se ha demostrado tiene una participación importante en el desarrollo del cáncer de próstata.

Otros factores que se han asociado al incremento en la incidencia de CaP son la dieta y la esterilización masculina. Una dieta rica en grasas de origen animal se ha relacionado con una mayor incidencia de cáncer de próstata, circunstancia que se ha observado en poblaciones de origen nórdico frente a la de origen mediterráneo. Se piensa que la ingesta de grasa estaría relacionada con la transformación del colesterol en testosterona. La vitamina D, por su implicación en el metabolismo lipídico, está considerada un factor protector. Por otro lado, diferentes estudios han observado una incidencia 1.7 veces mayor de cáncer de próstata en varones a los que se le ha practicado una vasectomía. Aunque unos autores atribuyen este aumento de incidencia a un probable aumento de testosterona tras la vasectomía, otros lo imputan a un sesgo de vigilancia en estos pacientes [20,25].

Cáncer de próstata, receptor de andrógenos y origen étnico

Hay poca información sobre el origen étnico o raza y la expresión del RA en tejidos de próstata benignos y malignos. Aunque en comparación con los caucásicos estadounidenses, los varones afroamericanos son más frecuentemente diagnosticados a una edad más temprana de inicio del CaP, presentan tumores de mayor volumen, más agresivos, puntuaciones de Gleason y niveles de PSA más altos. La mayoría de las investigaciones se realizan con muestras de tejido prostático provenientes de pacientes caucásicos, en los cuales, en general, las mutaciones del RA rara vez se encuentran en cáncer de próstata primario no tratado (<2%), pero se detectan en una alta frecuencia en tumores con privación de andrógenos, metastásicos o resistentes a la castración [7]. Por el contrario, en un estudio publicado por Koochekpour y colaboradores en 2014 [8], se encontró que las mutaciones somáticas del RA en cánceres de próstata primarios se

producen a un ritmo mayor en los afroamericanos que en los caucásicos estadounidenses. Estos resultados se correlacionan con otro estudio en el que los resultados muestran que los niveles de expresión de genes que están en redes de interacción proteómica (entre ellos el RA) son diferentes entre tejidos prostáticos normales contra tejido tumorales, correlacionándose positivamente con la supervivencia de pacientes de raza blanca (no hispanos), pero no con los varones afro-americanos [17,26]. Estudios como los anteriormente mencionados no están reportados para la población hispana o latina; particularmente en México, no hay estudios sobre las mutaciones del RA en varones mexicanos ni como contribuyen estas mutaciones a la progresión y agresividad del CaP, y por ende se desconoce su significado clínico e histopatológico en los mexicanos con CaP.

OBJETIVO

Objetivo General

Identificar mutaciones en el gen del receptor de andrógenos de varones mexicanos con cáncer de próstata.

Objetivos particulares

- Secuenciar el gen de RA para identificar mutaciones en tejido prostático de pacientes mexicanos con cáncer de próstata.
- Determinar la longitud del tracto de poliglutamina (CAG) en el exón 1 del gen de RA en la población mexicana.
- Examinar el polimorfismo del número de repetidos CAG en línea germinal.
- Construir una base de datos en la que se asocie la información clínica y familiar de pacientes mexicanos con cáncer de próstata con las mutaciones en el gen de receptor de andrógenos encontradas en estos pacientes.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

En la sección Anexo se encuentra la preparación de buffers utilizados en esta tesis y el formato de la carta de consentimiento informado.

Muestras clínicas

La recolección de biopsias se realizó después de obtener el consentimiento informado por escrito de los pacientes para su uso con fines diagnósticos y científicos antes de la cirugía de extracción de tejido prostático en la Clínica de Urología del Instituto Nacional de Cancerología.

Se recolectó tejido prostático tumoral y no tumoral (confirmado por patología) de varones mexicanos de 41 a 83 años de edad (**n=119**) sin tratamiento antagonista androgénico previo, con niveles séricos de APE mayores a 4 ng/mL y con síntomas relacionados a alguna patología prostática (es decir, disuria, hematuria, tacto rectal sospechoso, entre otros), originarios de diferentes estados del país: Ciudad de México, Puebla, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Chiapas, Tlaxcala y Veracruz.

Se recolectó sangre periférica de varones mexicanos con CaP (**n= 14**) y de varones mexicanos de 51 y 79 años de edad con niveles séricos de APE menores a 4 ng/mL sin diagnóstico de CaP (**n=10**) ni con síntomas relacionados a alguna patología prostática originarios de la Ciudad de México. La sangre periférica de todos los sujetos de estudio fue colectada en tubos Vacutainer conteniendo EDTA (*Becton Dickinson*).

Extracción del ADN genómico

Las mutaciones y/o variaciones en el *AR* se examinaron utilizando ADN genómico extraído de tejido prostático congelado y fresco (**n=55**). Para examinar alteraciones germinales en la secuencia del exón 1 del *AR* se utilizó el ADN extraído a partir de leucocitos de sangre periférica de varones mexicanos.

El ADN se extrajo utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Promega*), según lo recomendado por el fabricante de acuerdo al tipo de tejido (prostático o sangre). Las muestras de ADN se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop Epoch (*Biotek*). En la Figura 7 se muestra el diagrama de flujo general de la amplificación y secuenciación de los exones del *AR*.

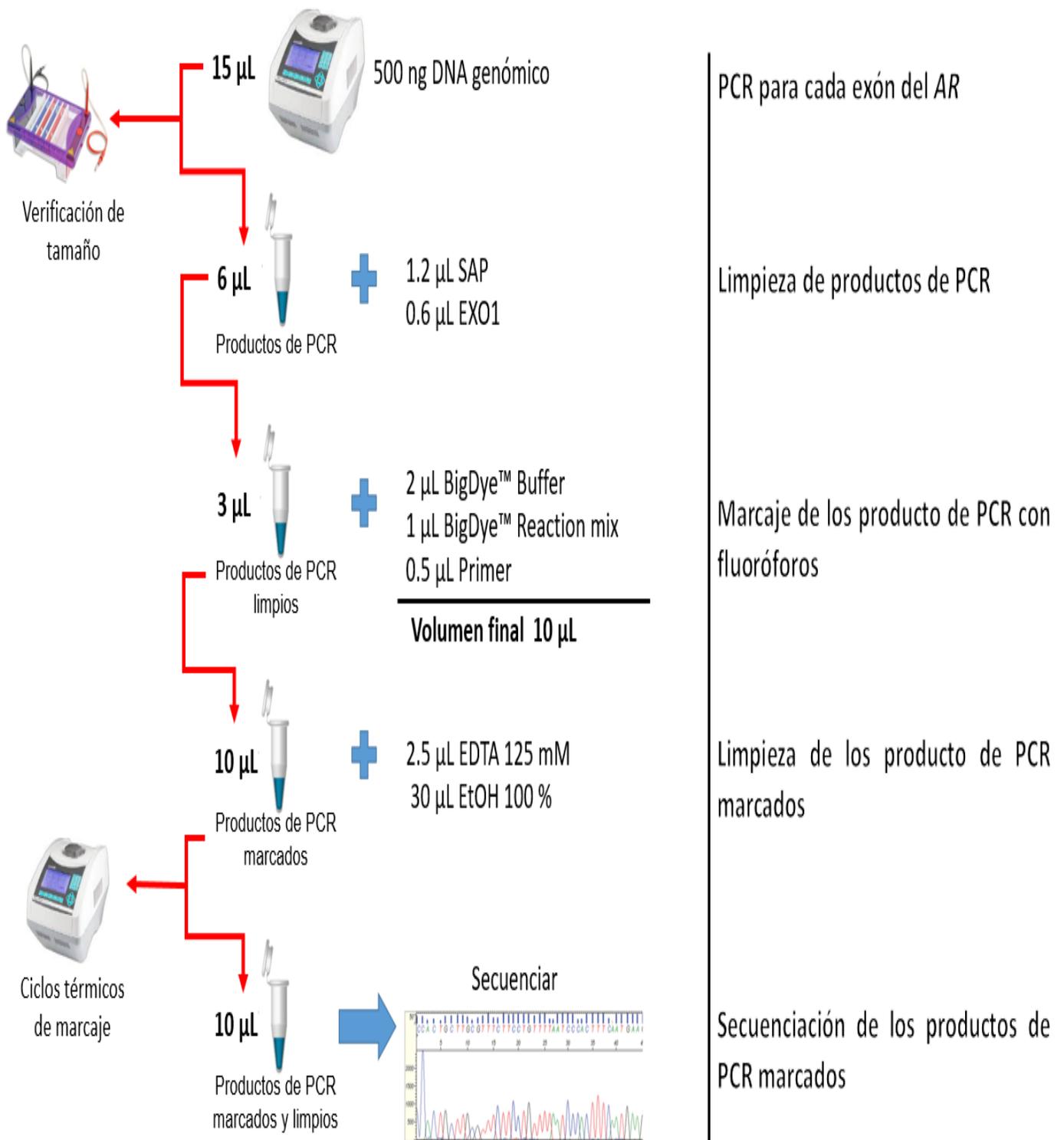


Figura 7. Diagrama de flujo de la amplificación y secuenciación de los exones del AR.

Amplificación de los exones del *AR*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando la secuencia de primers específicos para cada exón. Los primers para los exones 2,4,5,7 y 8 han sido reportados en la literatura [17]. Los primers correspondientes al exón 1,3 y 6 se diseñaron en esta tesis. El exón 1 del *AR* se decidió amplificarlo en tres fragmentos aquí denominados regiones 1a, 1b y 1c, a cada una se le diseñó un par de primers específico. La lista de primers utilizados en este trabajo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Pares de primers específicos para el *AR* que flanquean los límites de intrón-exón.

Exon o sitio polimórfico	5' sentido	5' antisentido	Tm/ Tamaño producto (pb)
1a	GCGACTACCGCATCATCACA	CTCATCCAGGACCAGGTAGC	58°C/ 432
1b	TTCTCCCAAGCCCATCGTA	CTAGGCTCTCGCCTTCTAGC	55°C/ 691
1c	CAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	TAGGAGCCGCTAGATACCCC	58°C/ 746
2	GCCTGCAGGTTAATGCTGAAGACC	CCTAAGTTATTTGATAGGGCCTTGCC	62°C/ 379
3	CTACGCCATGCTAAAGGGGTG	TAGAGCATGGCTGGTCCCCT	62°C/ 603
4	GGAGTTTGTAGAGTCTGTGACCAGG	GATCCCCCTTATCTCATGCTCCC	62°C/ 455
5	CAACCCGTCAGTACCCAGACTGACC	AGCTTCACTGTCACCCCATCACCATC	62°C/ 284
6	CAGCAGGAGAAACAGCAAGCTC	AGTGGTCCTCTCTGAATCTCTGT	62°C/ 314
7	CTTTCAGATCGGATCCAGCTATCC	CTCTATCAGGCTGTTCTCCCTGAT	62°C/ 415
8	GAGGCCACCTCCTTGTC AACCCCTG	GGAACATGTTTCATGACAGACTGTACATCA	62°C/ 347

Acceso NCBI NM_000044.3

Se utilizaron 500 ng del ADN genómico para amplificar cada exón del *AR*. La reacción de PCR para cada exón se realizó por duplicado, en un volumen de 15µL y 35 ciclos. Se utilizó a la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) para llevar a cabo la PCR, utilizando las condiciones del fabricante.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes requeridos para la preparación de la mezcla de reacción para cada exón.

Reactivo	Volumen
High Fidelity Buffer 10 X	3 μ L
dNTP Mix 10 mM	0.3 μ L
MgSO ₄ 50 mM	0.6 μ L
Forward primer 10 μ M	0.3 μ L
Reverse primer 10 μ M	0.3 μ L
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U / μ L)	0.1 μ L
Agua libre de RNasas	Variable
ADN templado 500 ng	Variable
Betaína 5M * (Sigma-Aldrich)	3 μ L
Volumen total	15 μL

*Reactivo utilizado solo para la amplificación de las regiones b y c del exón 1 del AR con alto contenido de guaninas y citosinas.

Tabla 4. Condiciones del termociclador.

Desnaturalización inicial	95 °C / 5 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C /45 s	35 ciclos
Alineación	55 a 62 °C /45 s	
Elongación	68 °C / 1 min	
Elongación final	68 °C / 10 min	1 ciclo

Electroforesis en gel

En este trabajo se utilizaron geles de agarosa al 1.2% p/v en buffer TBE 0.5X con bromuro de etidio (10 mg/mL). La agarosa utilizada fue de la marca *Bio-Rad*. Las muestras se prepararon adicionando buffer de carga *6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific)* y se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)*. Los geles se corrieron a 120 V por 60 min.

Tratamiento de los productos de PCR

Una vez terminada la PCR, los fragmentos de ADN se limpiaron como se encuentra señalado en la Tabla 5. Cada producto de PCR se trató con fosfatasa alcalina de camarón

(SAP), para inactivar los nucleótidos restantes y con exonucleasa I (EXO I), para degradar los oligonucleótidos que quedaban aún de la reacción.

Tabla 5. Limpieza enzimática de productos de PCR

SAP	1.2 μ L
EXO I	0.6 μ L
PCR-ADN	6 μ L
Volumen total	7.8 μL

Incubar 20 min a 37 °C y 10 min a 80°C.

Marcaje de los productos de PCR para secuenciación tipo Sanger

Una vez que se limpiaron los productos de PCR se realizó el marcaje del ADN como se encuentra señalado en las Tablas 6 y 7. Para ello se empleó el BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*).

Tabla 6. Reactivos y volúmenes requeridos para la mezcla de marcaje de los productos de PCR.

Componente	Forward	Reverse
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2 μ L	2 μ L
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 μ L	1 μ L
Producto de PCR limpio	3 μ L	3 μ L
Forward Primer 10 μ M	0.5	-----
Reverse Primer 10 μ M	-----	0.5
Agua libre de DNAsas y RNAsas	Variable	Variable
Betaína 5M*	2 μ L	2 μ L
Volumen Total	10 μL	10 μL

*Reactivo utilizado solo para el marcaje de las regiones b y c del exón 1 del AR con alto contenido de guaninas y citosinas.

Tabla 7. Condiciones del termociclador.

Incubación	96 °C/ 3 min	25 ciclos
Desnaturalización	96°C / 1 min	
Alineación	50°C / 5 s	
Elongación	60°C / 4 min	
Mantenimiento	4°C	Hasta purificación

Limpieza de la reacción para secuenciación

Al terminar el marcaje de los productos de PCR con fluoróforos la reacción final de 10 µL se limpió para eliminar la presencia de sales, terminadores dye no incorporados y oligonucleótidos restantes que puedan interferir en la lectura de fluorescencia. Para lo cual se empleó el método de purificación EDTA/Etanol.

Método de purificación de ADN EDTA/ Etanol

- EDTA 125 mM a partir de EDTA 0.5 M pH 8.0.
 - Etanol absoluto (95 – 100%)
 - Etanol al 70%
1. Agregar en el siguiente orden los reactivos:

Alícuota para Secuenciación	10 µL
EDTA 125 mM	2.5 µL
Etanol Absoluto (95 – 100%)	30 µL
Volumen Total	42.5 µL

2. Incubar 15 min a temperatura ambiente (TA)
3. Centrifugar a 3000 g (4°C) durante 30 min.
4. Quitar sobrenadante por decantación.
5. Agregar 30 µL de Etanol al 70%.
6. Centrifugar a 3000 g (4°C) durante 15 min.
7. Quitar sobrenadante con pipeta.
8. Secar a 37°C protegido de la luz.

Los amplicones fueron analizados por electroforesis capilar en el 3500 xL ADN Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) ubicado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Visualización de secuencias

Las secuencias se examinaron mediante el software Serial Cloner (v. 2.6.1) y se compararon con el gen *AR* (*Homo sapiens androgen receptor*) de la base de datos genética NCBI (No. Acceso NM_000044.3). La secuencia de este gen no proviene de la secuenciación del genoma humano realizada por Venter y colaboradores en el año 2000.

Análisis estadístico

La base de datos y los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software estadístico SPSS v.22. La distribución de las características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio se representó en números y porcentajes. Se realizó un análisis univariante utilizando medidas de centralización (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango) para las variables cuantitativas y proporciones o porcentajes para las cualitativas. Se utilizó un análisis bivariado mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para comparación de proporciones y prueba T de Student para la comparación de medias. Se consideró la asociación estadísticamente significativa si los valores p eran menores que 0.05.

RESULTADOS

Características clínicas

Se recolectaron **119** biopsias de tejido prostático de pacientes mexicanos con un posible diagnóstico de cáncer. De las cuales, **70 biopsias** fueron **histológicamente positivas** para cáncer prostático. Se seleccionaron, aleatoriamente, **36 biopsias** histológicamente positivas para secuenciar todos los exones del gen del RA.

El diagnóstico en un 88.9% de los casos fue clasificado como de alto grado o pobremente diferenciado (Gleason ≥ 7). Siendo los grados de malignidad predominantes, 7 y 9 (Tabla 8). El tejido prostático secuenciado provenía en su mayoría de pacientes originarios de la Ciudad de México y la región Centro del país; no se tuvieron muestras de pacientes originarios de las regiones Norte y Noreste del país. Es notable que el 60% del tejido prostático fue reportado con invasión perineural. No se encontró asociación significativa entre el grado de malignidad y el APE ($r= 0.059$, $P= 0.68$).

Visualización de amplicones

Por electroforesis en gel de agarosa se verificó el tamaño correcto de todos los exones del *AR* amplificados para cada una de las muestras empleadas en este trabajo (ADN de biopsias y de línea germinal leucocitaria, $n =90$). Como se mencionó anteriormente, el gen *AR* consta de ocho exones (ver Tabla 2). Debido a que el exón 1 consta de 1617 pb, se decidió amplificarlo en tres fragmentos de 432, 691 y 746 pb, aquí denominadas regiones 1a, 1b y 1c. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los ocho exones del *AR* amplificados.

Tabla 8. Características clínicas de la población de estudio.

Característica	Casos n =36 (100%)
Edad (años)	
Promedio	65.64 ± 9.50
Rango	41-82
Gleason	
3	1 (2.78)
6	3 (8.33)
7	18 (50.00)
8	6 (16.67)
9	7 (19.44)
10	1 (2.78)
Lugar de nacimiento^a	
Ciudad de México	17 (47.22)
Centro	11 (30.56)
Suroeste	3 (8.33)
Occidente	5 (13.89)
IMC	
Normal	14 (38.89)
Sobrepeso	17 (47.22)
Obesidad	5 (13.89)
Comorbilidad	
Ninguna	20 (55.56)
DM2	8 (22.22)
HTA	3 (8.33)
Ambas	5 (13.89)
Ex Fumador	
No	19 (52.78)
Sí	17 (47.22)
Invasión perineural	
No	12 (33.33)
Sí	24 (66.67)
Historia familiar de CaP	
No	32 (88.89)
Sí	4 (11.11)

^aLugar de nacimiento: Ciudad de México. **Centro:** Estado de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala; **Suroeste:** Guerrero y Chiapas; **Occidente:** Guanajuato y Michoacán.

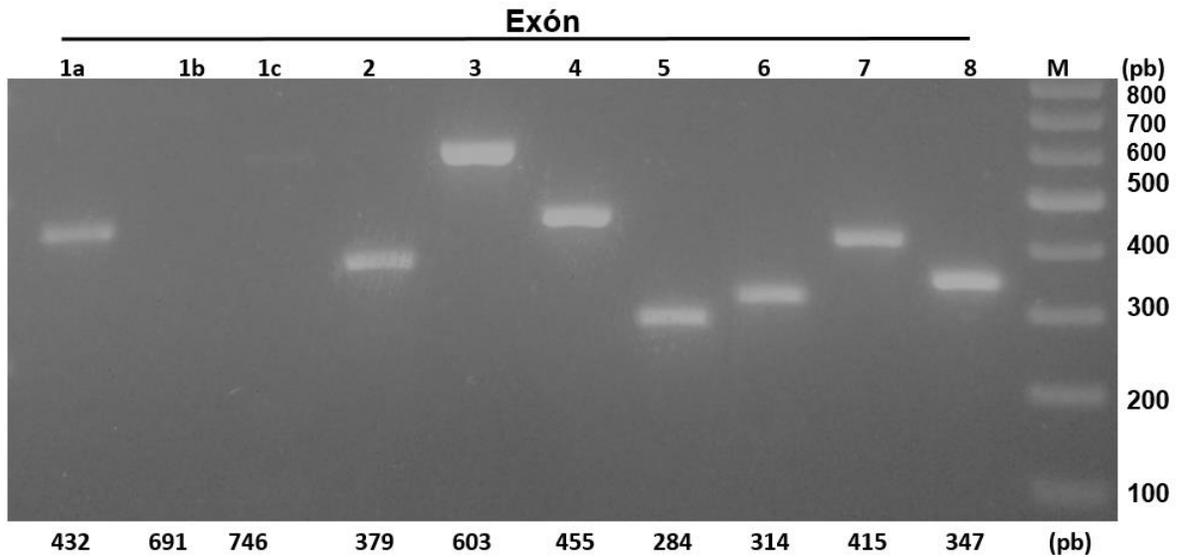


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% p/v de los productos amplificados mediante PCR de los exones del AR [1(a, b,c) a 8]. M = marcador de peso molecular 100 pb.

Como se aprecia en la Figura 8, las regiones b y c del exón 1 no se amplifican. Por ello a la mezcla maestra de PCR se le añadió Betaína 1M (concentración final), que favorece la desnaturalización del ADN en regiones con alto contenido de guaninas y citosinas. La Betaína sólo se usó para amplificar las regiones b y c del exón 1 (Figura 9 y 10).

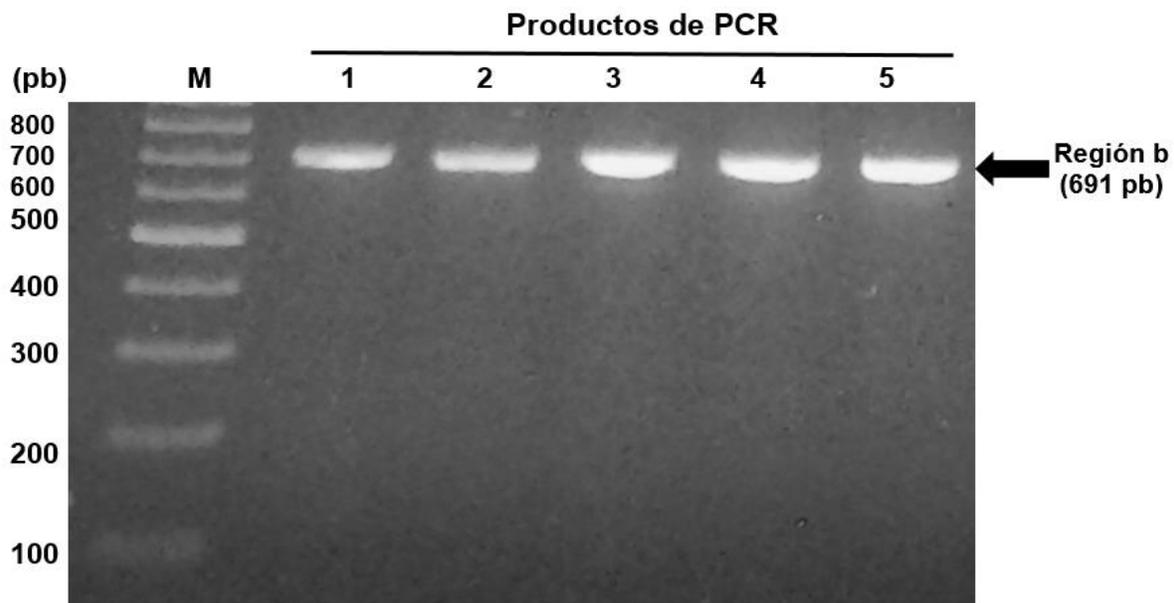


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% p/v de la región b del exón 1 del AR. Carriles 1 – 5: productos de PCR (691 pb) de diferentes biopsias. M= marcador de peso molecular 100 pb.

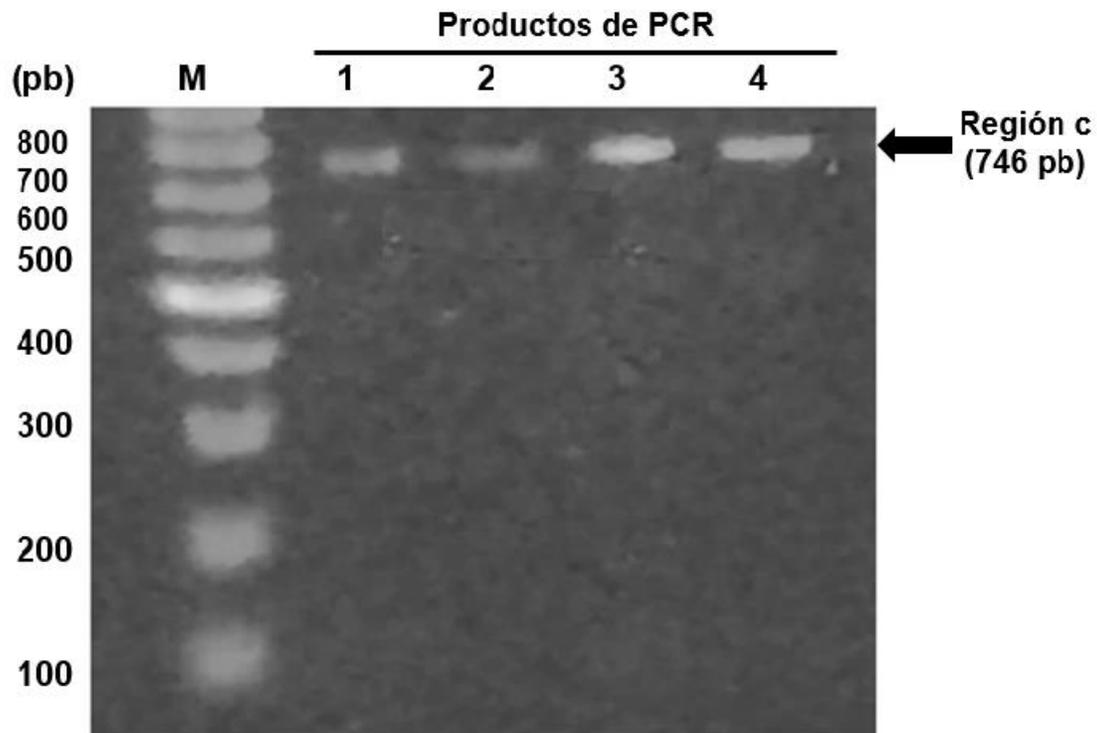


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% p/v de la región c del exón 1 del AR. Carriles 1 – 4: productos de PCR (746 pb) de diferentes biopsias. M= marcador de peso molecular 100 pb.

Mutaciones somáticas en el AR

Las mutaciones somáticas del *AR* fueron identificadas por comparación con la secuencia del gen *AR* en la base de datos genética NCBI (NM_000044.3). De las 36 biopsias prostáticas secuenciadas, 22 presentaron algún tipo de mutación y/o polimorfismo, pero sólo en el exón 1 del *AR* (61%). En los exones 2 a 8 no se encontraron mutaciones.

En total, 7 alteraciones fueron identificadas en el exón 1 (Tabla 9). De las 22 biopsias de tejido prostático con alteración, se encontró que, el 91% varía en el número de codones CAG (expansión o disminución) considerando como referencia el número reportado por el NCBI para la secuencia del *AR* (22 repetidos CAG). El restante 9% tiene mutaciones sin sentido y/o mutaciones de sentido erróneo, todas ellas en el NTD. Dichas mutaciones son conservativas y/o sinónimas.

Tabla 9. Mutaciones y polimorfismos en el exón 1 del AR de biopsias de tejido prostático de varones mexicanos con CaP hallados en este estudio.

Dominio RA	Mutación encontrada		No. muestras	Grado Gleason	Tipo de mutación
	mRNA posición	Aminoácido			
NTD	254 Δ 2G	W92X	1	7	Sin sentido
	238_239 CAG:CAG	Expansión repetidos de Q	17	6,7,8,9,10	—
	238_239 Δ CAG	Disminución repetidos de Q	3	7,8	—
	273 G>T	Q90H	1	6	Sentido erróneo
	328 C>A	L110M	2	6,7	Sentido erróneo
	433 C>G	L145V	1	8	Sentido erróneo
	735 G>A	V 245 V	1	7	Sinónima

Al no encontrar mutaciones en los exones 2 a 8 del AR en las 36 biopsias prostáticas secuenciadas se decidió enfocarse únicamente en el exón 1, específicamente en la región 1a donde se encuentran localizados los repetidos de CAG. A partir de este momento todos los resultados presentados se refieren únicamente al número de repetidos de CAG en diferentes muestras secuenciadas (biopsias de tejido prostático y línea germinal leucocitaria tanto de pacientes con diagnóstico de Cap, sin Cap y sanos). Cabe destacar que en línea germinal no se encontraron las mutaciones somáticas sin sentido y de sentido erróneo reportadas en la tabla 9.

Repetidos de CAG en tejidos prostáticos

Se secuenció el exón 1 del AR de 13 biopsias de tejido prostático de pacientes con CaP, adicionales a las 36 ya secuenciadas, alcanzando con ello 49 biopsias con CaP. Además, de 49 biopsias que resultaron negativas histológicamente para cáncer prostático, 19 fueron elegidas aleatoriamente para secuenciar el exón 1 del AR. En total, se secuenció el exón 1 de AR de 68 biopsias prostáticas. La frecuencia de distribución del número de repetidos de

CAG de toda la población de tejidos prostáticos analizados (n= 68) está representada en la Figura 11. Siendo el promedio de la población en general, mayor a 22 repetidos de CAG (23.07 ± 0.25).

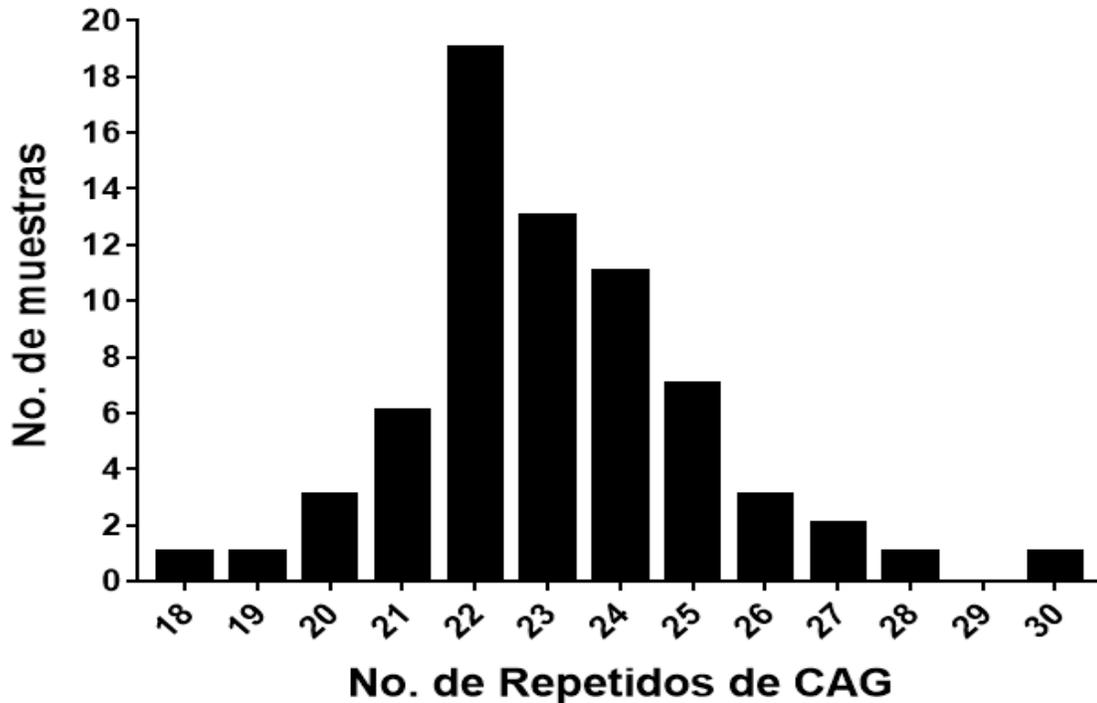


Figura 11. Distribución del número de repetidos de CAG en AR de la población de tejidos prostáticos (con y sin CaP).

Repetidos de CAG en tejidos prostáticos de pacientes con CaP

La frecuencia de distribución de repetidos de CAG en la población con CaP (n=49) está representada en la Figura 12. En el 51% de los casos el número de repetidos fue mayor a 22, el 40.8% igual a 22 y sólo 8.2% menor a 22. El número de repetidos de CAG más pequeño fue 19 y el más grande 27; los grados de malignidad predominantes fueron 7, 8 y 9.

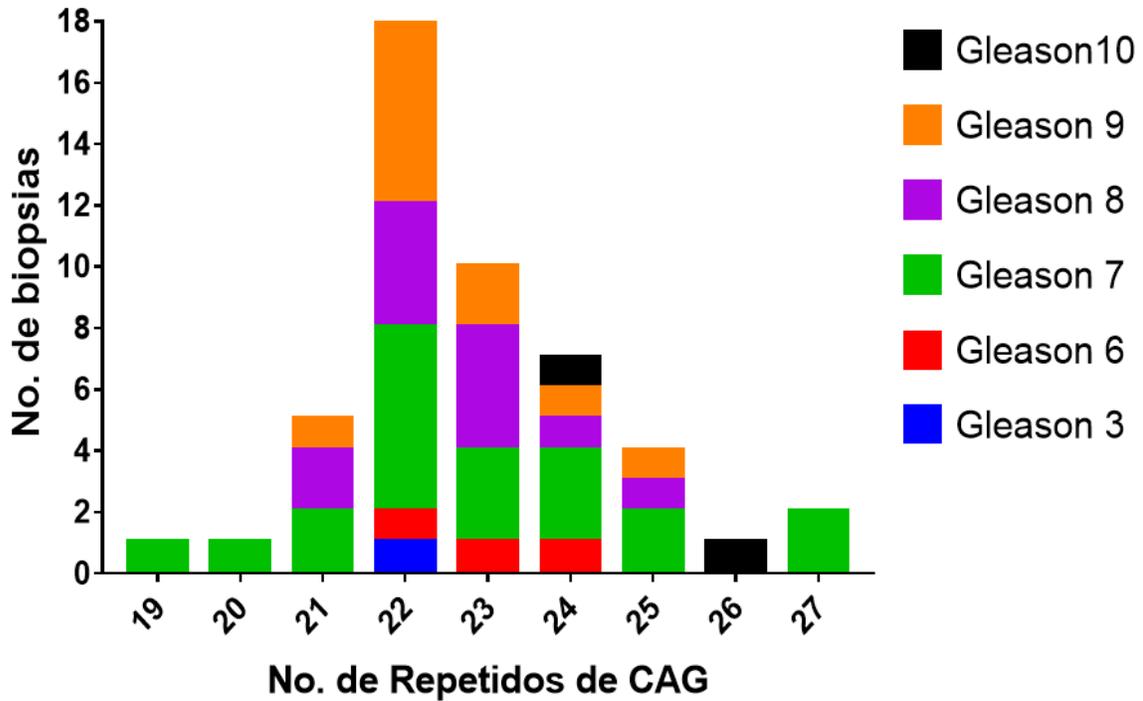


Figura 12. Distribución del número de repetidos de CAG en el AR de tejido prostático de varones mexicanos con CaP.

Repetidos de CAG en tejidos prostáticos de varones sin diagnóstico de CaP

De las 19 biopsias histológicamente negativas para cáncer prostático que fueron secuenciadas, al 36.8% se les asignó un diagnóstico de prostatitis, el 15.8% un diagnóstico de hiperplasia benigna, el 36.8% no tuvo un diagnóstico determinado y el 10.8% no presentó ningún tipo de patología prostática. El número de repetidos de CAG fue en un 73.7% mayor a 22. El valor numérico de repetidos predominante fue 24 (21.1%). El número de repetidos de CAG más pequeño fue 18 y el más grande 30 (Figura 13).

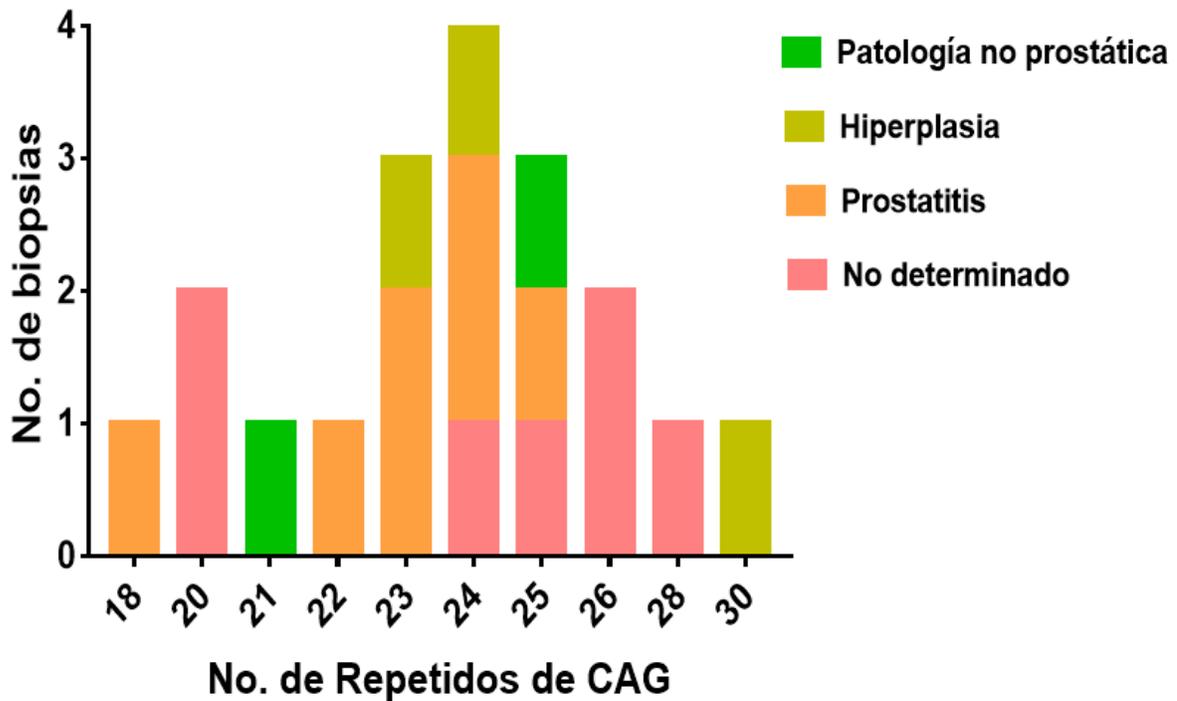


Figura 13. Distribución del número de repetidos de CAG en el AR de tejido prostático de varones mexicanos sin diagnóstico de CaP. Las muestras identificadas como “Patología no prostática” (barra verde) corresponden a pacientes con cáncer de tipo testicular y de parótida.

Comparación de poblaciones

La comparación de la distribución de repetidos de CAG entre la población con CaP y la diagnosticada sin CaP arrojó que el número más frecuente en los dos grupos fue 23 y 24 (promedio 22.82 ± 1.62 vs. 23.74 ± 2.85). Esta comparación no fue estadísticamente significativa (Figura 14). Sin embargo, hay una tendencia a que el número de repetidos de CAG en ambas poblaciones es mayor a 22 (Figura 15). Al realizar un análisis dicotómico de las poblaciones (≤ 22 vs. > 22) se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la población sin diagnóstico de CaP con un número de repetidos mayor a 22 y la población con CaP con un número de repetidos menor o igual a 22 (No CaP > 22 vs CaP ≤ 22), lo que sugiere que el número de repetidos de CAG ≤ 22 es un punto de corte para CaP.

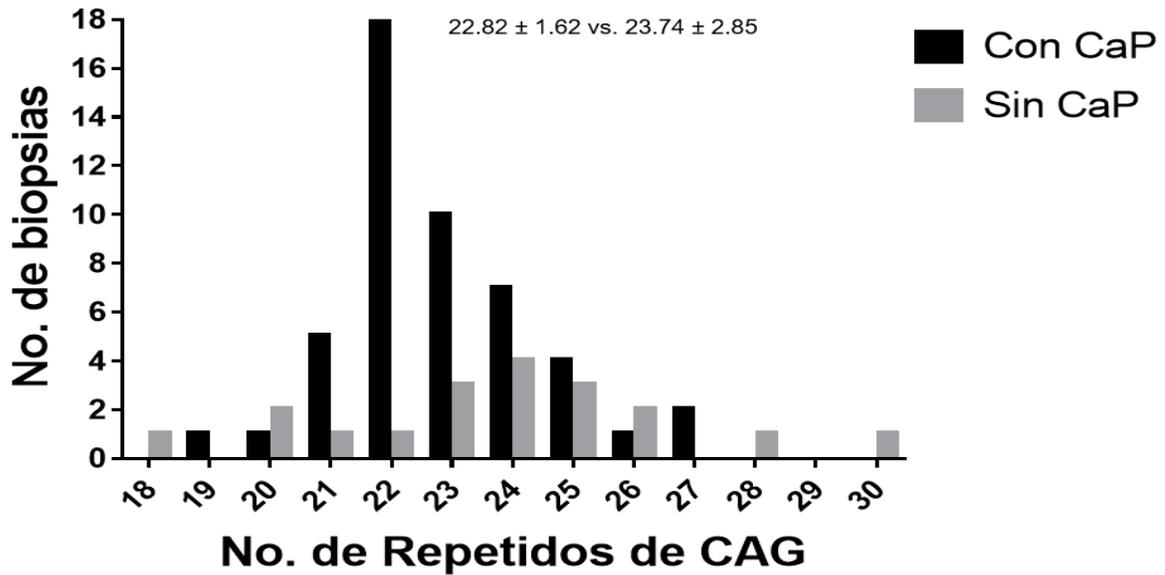


Figura 14. Distribución del número de repetidos de CAG en AR, de acuerdo a la población con CaP y sin diagnóstico de CaP. Prueba de Kruskal-Wallis, valor $P=0.061$, $\alpha=0.05$

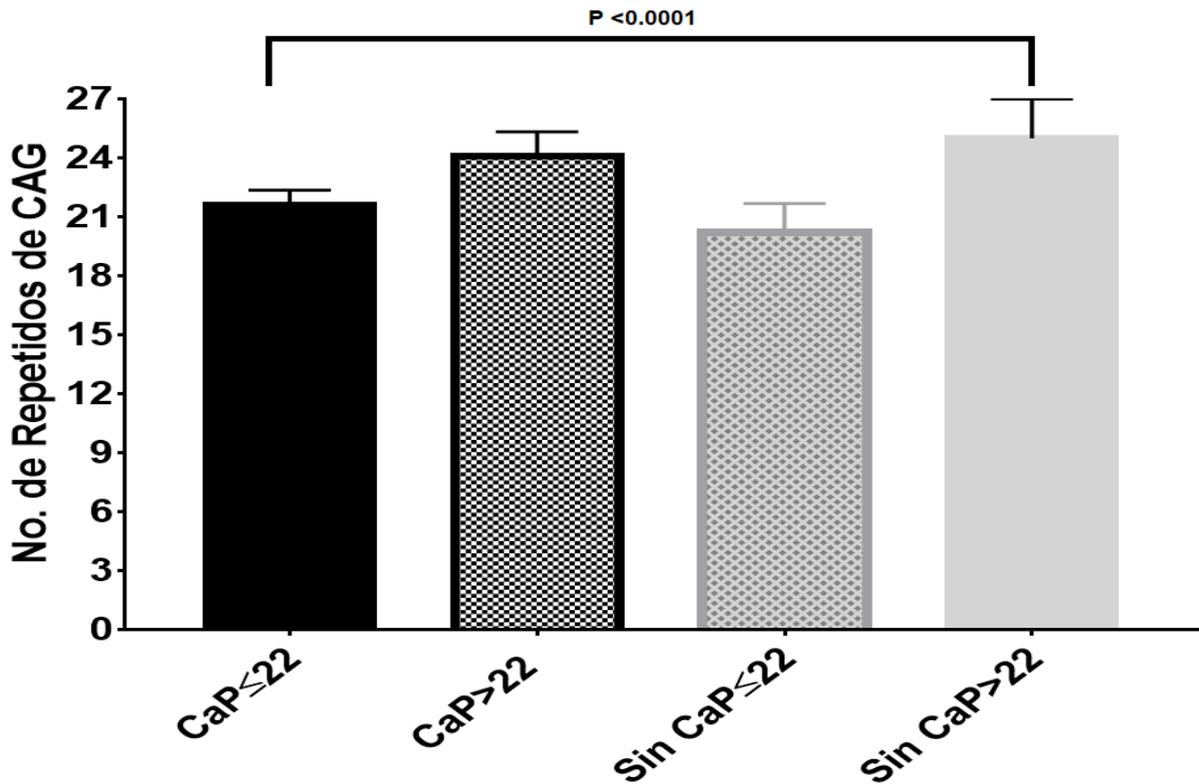


Figura 15. Comparación del número de repetidos de CAG (≤ 22 vs. > 22) entre la población con CaP y sin diagnóstico de CaP. Prueba de rango múltiple de Duncan, $\alpha=0.05$

Correlación de las características clínicas con el número de repetidos de CAG

En este estudio no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el número de repetidos de CAG y las características clínicas de los pacientes con CaP. Sin embargo, se observaron tendencias positivas entre el promedio de repeticiones de CAG y algunas características clínicas. Los varones menores a 60 años de edad presentaron en promedio un menor número de repetidos (22.36 ± 1.20) que los mayores a 60 años (23.03 ± 1.76). En el índice de masa corporal (IMC) de los varones analizados, el promedio de repeticiones de CAG fue mayor en varones con obesidad (23.33 ± 2.18). Además, el número promedio de repeticiones de CAG entre los varones con antecedentes familiares de CaP fue menor (22.00 ± 1.50), pero no fue estadísticamente significativo (Tabla 10).

Polimorfismo de repetidos de CAG del AR en línea germinal

Para examinar el polimorfismo del número de repetidos CAG en el exón 1 del AR en línea germinal, se analizó el ADN leucocitario tanto de pacientes diagnosticados con CaP ($n=14$) como de varones sin ninguna patología prostática denominados en este estudio como controles ($n=10$). En la Tabla 1 del Anexo se describen las características clínicas de dichas poblaciones.

Posteriormente, se comparó la distribución del número de repetidos de CAG entre las muestras de línea germinal con CaP y los controles. El rango de repetidos de CAG para los casos con CaP abarcó desde 18 a 28 y para los controles de 15 a 25. Los números de repetición más frecuentes en ambas poblaciones fueron 18,19,21,22 y 23 (promedio, 23.64 ± 3.05 vs. 20.2 ± 3.29). No hay diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones (Figura 16).

Tabla 10. Repetidos de CAG en el AR de acuerdo a las características clínicas de la población con CaP.

Característica	N= 49 (100%)	Repetidos CAG; Media ± DE	r ^a	Valor de P ^b
Edad				
≤ 60 años	16 (32.65)	22.36±1.20	0.192	0.186
> 60 años	33(67.35)	23.03 ± 1.76		
Gleason				
< 7	4 (8.16)	22.75 ± 0.96	0.012	0.933
≥7	45 (91.84)	22.82 ± 1.67		
Lugar de nacimiento ^c				
Ciudad de México	26 (53.10)	22.89 ± 1.84	-0.038	0.796
Centro	14 (28.57)	22.79 ± 1.12		
Suroeste	3 (6.12)	22.33 ± 0.58		
Occidente	6 (12.24)	22.83 ± 2.14		
IMC				
Normal	15 (30.61)	22.73 ± 1.03	0.109	0.455
Sobrepeso	25 (51.02)	22.68 ± 1.70		
Obesidad	9 (18.37)	23.33 ± 2.18		
Comorbilidad ^d				
Ninguna	25 (51.02)	22.64 ± 1.29	0.151	0.301
DM2	11 (22.45)	22.45 ± 1.22		
HTA	5 (10.20)	24.40 ± 1.94		
Ambas	8 (16.33)	22.88 ± 2.42		
Ex Fumador				
No	26 (53.06)	22.96 ± 1.95	-0.097	0.509
Sí	23 (46.94)	22.65 ±1.15		
Historia familiar de CaP				
No	40 (81.60)	23.00 ± 1.60	-0.242	0.094
Sí	9 (18.40)	22.00 ± 1.50		

^a Coeficiente de correlación de Pearson.

^b α=0.05

^c Lugar de nacimiento: Ciudad de México. **Centro:** Estado de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala; **Suroeste:** Guerrero y Chiapas; **Occidente:** Guanajuato y Michoacán.

^d Comorbilidad: DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; HTA: Hipertensión arterial.

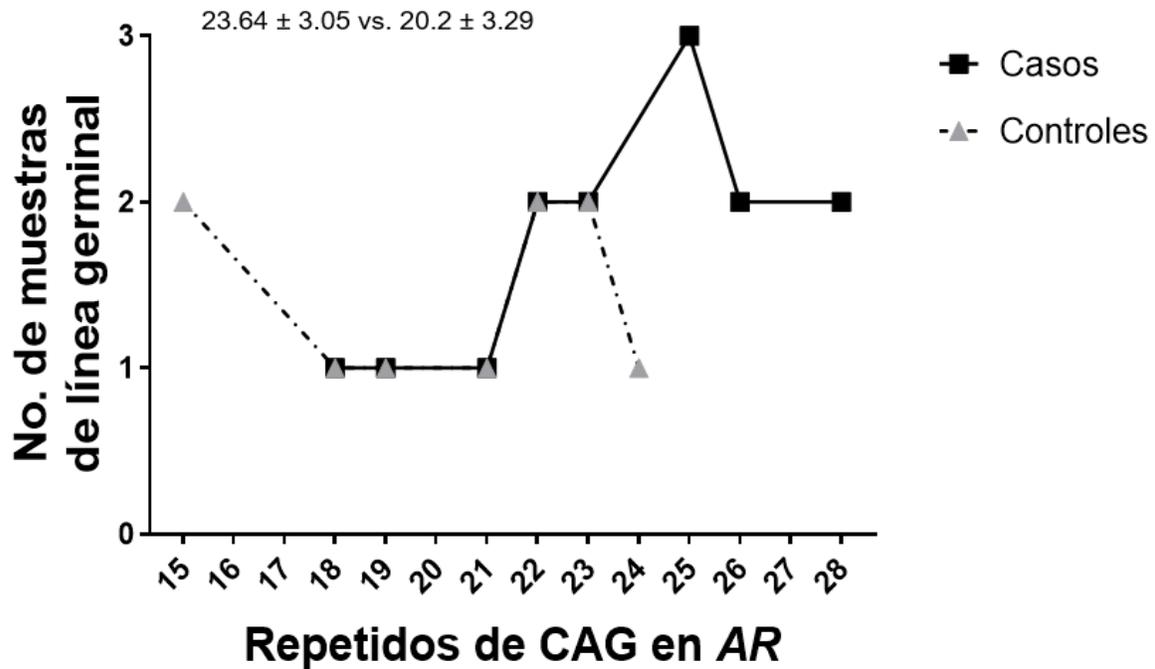


Figura 16. Distribución del número de repetidos de CAG en AR, entre casos y controles en línea germinal. Prueba de Kruskal- Wallis, valor $P=0.524$, $\alpha =0.05$.

Por último, se realizó la comparación pareada entre las biopsias de tejido prostático y las muestras de línea germinal leucocitaria de la misma población de individuos con CaP ($n=11$). Para ambas poblaciones el número de repeticiones CAG más frecuentes fueron 22, 23, 25 y 26 (23.62 ± 3.10 vs. 22.62 ± 1.56 ; $P= 0.26$). Existe correlación positiva entre ambas poblaciones ($r=0.27$, $P=0.35$), es decir, si el número de repetidos CAG es grande en tejido prostático también lo será en línea germinal leucocitaria e igualmente con valores pequeños. Sin embargo, el valor del coeficiente de correlación r es muy pequeño, apenas sobrepasa el cero, por lo que la relación directa entre ambas poblaciones no es patente y no es estadísticamente significativa (Figura 16).

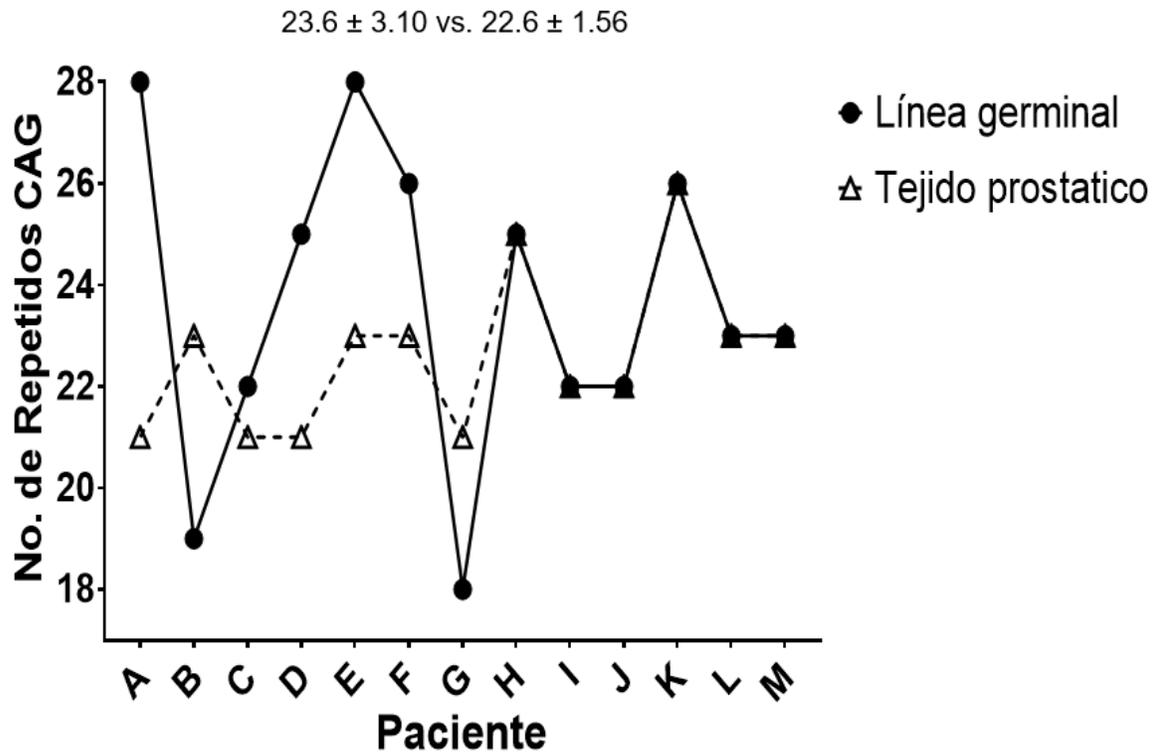


Figura 17. Distribución de la longitud de repetición de CAG en AR, entre tejido y línea germinal de pacientes con CaP. Prueba t de Student pareada, valor $P=0.26$.

DISCUSIÓN

En México, el cáncer de próstata es actualmente la primera causa de morbilidad y mortalidad entre los varones [21]. El receptor de andrógenos es un gen clave implicado en la etiología y la oncogénesis de este cáncer, es decir en el desarrollo de la enfermedad, la progresión, la respuesta al tratamiento hormonal inicial y la subsecuente resistencia a las terapias hormonales. En este trabajo se identificaron mutaciones y/o polimorfismos en el receptor de andrógenos de tejidos prostáticos de pacientes mexicanos con cáncer de próstata.

Para identificar posibles mutaciones en el receptor de andrógenos, se recolectaron muestras prostáticas de pacientes originarios de las regiones Ciudad de México, Centro, Occidente y Sureste del país. La distribución regional observada se correlaciona con la del Registro Nacional Histopatológico de Cáncer de 1993 a 2002 [27]; que reporta que la Ciudad de México es el sitio con mayor prevalencia de la enfermedad prostática, seguido por los estados del centro y sur del país.

Si bien, en este estudio la correlación entre el grado de malignidad de los tumores y el APE de los pacientes no fue estadísticamente significativa, sí observamos una tendencia en la que los pacientes llegan al hospital con la enfermedad en estados de intermedios a avanzados y con ello pronósticos de regulares a malos. En otros estudios esta tendencia ha sido extensivamente descrita [28-31].

De las mutaciones somáticas sin sentido y de sentido erróneo identificadas en este estudio, sólo una ha sido previamente reportada por Yeh y colaboradores en el año 2007 [29] y posteriormente anexada a la base de datos de mutaciones del gen de Receptor de Andrógenos publicada en el año 2012 por Gottlieb y colaboradores [6]. Se trata del cambio del aminoácido Glutamina por Histidina en la posición 90 (Q90H), que se encontró en un varón con carcinoma hepatocelular primario [6,32]. El resto de las mutaciones sin sentido y de sentido erróneo encontradas son exclusivas de las muestras secuenciadas en este trabajo, es decir, no se han sido reportadas en otros estudios. Sin embargo, al tener poca representatividad numérica, difícilmente se podrían tomar como específicas para la población de varones mexicanos.

Si bien hay más de 100 mutaciones somáticas reportadas en varones con cáncer prostático (ver Figura 5), las mutaciones del receptor de andrógenos en una etapa temprana del cáncer o del cáncer no tratado son muy raras, pero son comunes en el cáncer resistente

a la castración, presentándose en el 10 a 30% de los pacientes previamente tratados con antiandrógenos de primera generación, como la bicalutamida y especialmente la flutamida [33]; es quizá por ello que en este estudio no se encontró un número significativo de mutaciones puesto que el tejido prostático provenía de pacientes sin tratamiento previo.

El gen AR contiene la repetición altamente polimórfica (CAG)_n en el exón 1 que codifica un tracto de glutamina en el dominio de transactivación N-terminal de la proteína, activado sólo después de que el RA se une a su ligando [34]. El número de repetidos de CAG en el ADN de varones sanos varía entre 11 y 31 repeticiones. La longitud del tracto de poliglutamina está inversamente correlacionada con la actividad transcripcional del receptor, es decir, se ha asociado tramos más largos con niveles más bajos de transcripción mediada por el receptor de andrógenos en estados normales y de enfermedad [35-37]. Sin embargo, el promedio en el número de repeticiones de CAG ha sido discrepante entre poblaciones y aún más su asociación con el cáncer de próstata [38-40]. En numerosos estudios se ha reportado que la longitud promedio del tracto (CAG)_n de la población afrodescendiente es ligeramente más corta que en la población caucásica, mientras que la población asiática tiene un número de repetición más largo que las otras razas. En decir, el número promedio de repetidos de CAG en población sana ha sido reportado entre 18 a 19 en afrodescendientes, 21 a 22 en caucásicos y 22 a 23 en asiáticos, en donde un número corto de repetidos de CAG en comparación con el promedio según la raza, se ha relacionado con la alta incidencia de cáncer prostático, particularmente en poblaciones afrodescendiente y caucásica [41].

A pesar de que hay numerosos estudios sobre el número de repetidos de CAG y su relación con el CaP en la población africana, caucásica y asiática, sólo hay unos cuantos reportes en los que incluyen a la población latina [39,40,42-44] y sólo un estudio en el que la cohorte utilizada es totalmente mexicana y residente de la Ciudad de México. Este es de hecho, el primer estudio publicado que examina el papel del número de repetidos de CAG como factor de riesgo para cáncer de próstata en varones mexicanos, proponiendo como un posible punto de corte (es decir, el valor o rango numérico estadísticamente significativo que determina si un individuo presenta o no la enfermedad), el tener un número de repetidos menor a 19. [45]. Por lo anterior, este trabajo es el segundo estudio enfocado en la población de varones mexicanos.

En este trabajo el número de repetidos de CAG, en promedio, fue de 22.82 ± 1.62 en tejido prostático de pacientes con CaP y de 23.74 ± 2.85 en aquellos tejidos sin

diagnóstico de CaP. Al comparar ambas poblaciones no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, es notable que la tendencia en el número de repetidos de CAG en la población sin cáncer es ser mayor a 22 (valor tomado como punto de corte de acuerdo a la secuencia del gen *AR* ubicada en el NCBI). Tanto en las muestras analizadas de tejido como de línea germinal (casos y controles) los números más frecuentes fueron 22,23 y 24; abarcando una distribución general de 15 a 30 repetidos. Estos datos sugieren que la población mexicana posee un tracto de repetidos de CAG más largo que poblaciones caucásicas y afrodescendientes e igual o mayor que la población asiática. Nuestros resultados son consistentes con dos estudios que incluyen a la población mexicana: el estudio de Ackerman y colaboradores [39] en donde el promedio de repetidos de la cohorte hispana con ancestría mexicana es de 22.6 ± 3.1 , con un rango de repeticiones de 12 a 31, y el estudio de O'Brien y colaboradores [41] que señala como promedio del número de repetidos de CAG en mexicanos 24.7 ± 1.9 , con un rango de repeticiones de 21 a 29. Además, los resultados de este trabajo sugieren como punto de corte para CaP el tener un número de repetidos menor o igual a 22.

En este estudio se encontraron algunas correlaciones positivas entre ciertas características clínicas y el número de repetidos de CAG (IMC y HTA), pero ninguna es estadísticamente significativa. Actualmente existen algunos estudios que han relacionado el número de repetidos de CAG del receptor de andrógenos con diversas patologías no relacionadas al cáncer de próstata, como son las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y el perfil lipídico [46,47], en los que se sugiere que un número corto de repetidos es un indicador de susceptibilidad para la enfermedad. No obstante, según nuestros resultados los pacientes con sobrepeso y presión arterial alta tuvieron, en promedio, un número largo de repetidos (23.33 ± 2.18 y 24.40 ± 1.94 , respectivamente) discrepando con lo ya descrito.

No se encontró correlación entre la agresividad del cáncer (grado Gleason) y el número de repetidos de CAG; sin embargo, otros trabajos han sugerido que la longitud de repetición de CAG sí puede asociarse con la agresividad de la enfermedad [38], pero aún no hay una claridad evidente al respecto.

Este estudio sugiere una asociación estadísticamente significativa consistente con la mayoría de reportes en afrodescendientes, caucásicos y asiáticos en el que los casos con cáncer prostático presentan un bajo número de repeticiones [39,40] si se considera

como punto de corte para la población mexicana un número de repetidos menor o igual a 22 .

En la literatura existen reportes que teorizan que la expansión del número de repetidos de CAG (mayor a 31 repeticiones) en diferentes genes, sobre todo en aquellos implicados en desordenes neurodegenerativos como es el gen *HD* en la enfermedad de Huntington, el *ATN1* en la atrofia dentato-rubro-palido-luisiana e incluso el *AR* en la atrofia muscular espino-bulbar, es debida al incremento de codones de poli-CAG durante el proceso de replicación [48]. También se ha sugerido que existe un contexto genético de residuos específicos conservados en eucariontes que han sido co-seleccionados con las poliglutaminas a lo largo de la evolución, flanqueándolas, determinando la expansión y/o agregación de repetidos [48-50]. Sin embargo, aún no hay nada concreto que explique por qué el número de repetidos de CAG varía en un mismo gen entre poblaciones de la misma especie, y aún menos hay información que explique por qué esta variación puede derivar en enfermedad, como por ejemplo en cáncer prostático. Es interesante que el gen *AR* de la especie fósil *Homo neanderthalensis* tiene 22 repetidos CAG [51]. Así mismo, las especies de primates más cercanas al ser humano, chimpancé y gorila, poseen 21 y 9 repetidos de CAG, respectivamente [52].

Entender el papel que juega el receptor de andrógenos en el desarrollo y progresión de cáncer ha sido el objeto de numerosos estudios alrededor del mundo, no así en Latinoamérica en donde las publicaciones referentes al tema son muy escasas. Es necesario realizar estudios con cohortes mexicanas más grandes para establecer parámetros que sean específicos de nuestra población como los hay en poblaciones caucásicas, asiáticas y afrodescendientes. Este trabajo tuvo como objetivo conocer los polimorfismos genéticos del RA de la población mexicana y así poder contribuir a la información que en un futuro pueda utilizarse para el reducir el riesgo de morbilidad y mortalidad por cáncer prostático

CONCLUSIONES

- Se identificaron cuatro mutaciones somáticas sin sentido y de sentido erróneo (W92X, L110M, L145V y V245V) en el exón 1 correspondiente al dominio N-terminal del gen de receptor de andrógenos que no habían sido reportadas en biopsias prostáticas de varones mexicanos con cáncer.
- Se encontró que el número de repetidos de CAG (glutamina) en la cohorte mexicana tiende a ser mayor a 22.
- Se propone como posible punto de corte para CaP un número de repetidos de CAG menor o igual a 22.

PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar bioquímicamente las variantes del RA con menor y mayor número de repetidos de CAG.

LITERATURA CITADA

1. Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*, 28(7), 778-808.
2. Rojas-Durán, et. al. (2011). The androgen receptor in the prostate physiopathology. *Eneurobiologia*, 2(2), 230511
3. Flórez Beledo, J., Armijo, j. & Mediavill, A. (2013). *Farmacología Humana. 6ta ed.* Barcelona, España: Elsevier Masson. pp 867-883.
4. Nussey S, Whitehead S. (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach.* Oxford: BIOS Scientific Publishers. Chapter 4, The adrenal gland. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26/>
5. Saatcioglu, F. (2011). *Androgen Action.* Humana Press/Springer, v. 776. 1064-3745.
6. Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Paliouras, M., & Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation*, 33(5), 887-894.
7. Chan, S. C., & Dehm, S. M. (2014). Constitutive activity of the androgen receptor. *Advances in Pharmacology*, 70, 327.
8. Koochekpour, S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 12(5), 639.
9. Schweizer, M. T., & Evan, Y. Y. (2015). Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 8(1), 128.
10. Eisermann, K., Wang, D., Jing, Y., Pascal, L. E., & Wang, Z. (2013). Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Translational Andrology and Urology*, 2(3), 137.
11. Schayek, H., Haugk, K., Sun, S., True, L. D., Plymate, S. R., & Werner, H. (2009). Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls IGF-I receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner. *Clinical Cancer Research*, 15(5), 1558–1565.
12. Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), R183-R196.
13. Van der Steen, T., Tindall, D. J., & Huang, H. (2013). Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14833-14859.

14. Pihlajamaa, P., Sahu, B., & Jänne, O. A. (2015). Determinants of receptor-and tissue-specific actions in androgen signaling. *Endocrine Reviews*, 36(4), 357-384.
15. *The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server* Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital McGill University. Montreal, Quebec, Canada. <http://androgendb.mcgill.ca/>
16. Ware, K. E., Garcia-Blanco, M. A., Armstrong, A. J., & Dehm, S. M. (2014). Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4), T87-T103.
17. Koochekpour, S., Buckles, E., Shourideh, M., Hu, S., Chandra, D., Zabaleta, J., & Attwood, K. (2014). Androgen receptor mutations and polymorphisms in African American prostate cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 10(6), 643.
18. Kufe, DW., Pollock, RE., Weichselbaum, RR., et al., editors. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker. Figure 111-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13217/figure/A27980/>
19. Sitio web del Instituto Nacional del Cáncer (<https://www.cancer.gov/espanol>)
20. Longo, D. L. (2012). *Harrison: principios de medicina interna. 18a. ed.* McGraw Hill Mexico. pp 796-805.
21. GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (2015).
22. Dirección General de Información en Salud. Cubos dinámicos 2014. http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/bdc_serviciosis.html
23. Eggener, S. E., Large, M. C., Gerber, G. S., Pettus, J., Yossepowitch, O., Smith, N. D., Kundu, S., Kunnavakkam, R., Zorn, K. & Raman, J. D. (2013). Empiric antibiotics for an elevated prostate-specific antigen (PSA) level: a randomised, prospective, controlled multi-institutional trial. *BJU International*, 112(7), 925-929.
24. Thompson, IM., Pauler, DK., Goodman, PJ, et al. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *New England Journal of Medicine*, 350(22), 2239-2246.
25. Jiménez-Ríos, MA, et al. (2016). *Actualidades y Perspectivas en cáncer de próstata* AstraZeneca, México. pp 25-43.
26. Zaman, Naif, et. Al. (2014). Proteomic-coupled-network analysis of T877A-androgen receptor interactomes can predict clinical prostate cancer outcomes between White (non-Hispanic) and African-American groups. *PloS One*, 9(11), e113190.

27. Meneses-García, A., Ruiz-Godoy, L. M., Beltrán-Ortega, A., Sánchez-Cervantes, F., Tapia-Conyer, R., & Mohar-Betancourt, A. (2002). Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica (1993-2002). *Rev Invest Clin*, 64(4), 322-329.
28. Shim, H. B., Lee, S. E., Park, H. K., & Ku, J. H. (2007). Histological Diagnosis of Prostate Cancer in Korean Men Aged 70–79 Years. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 37(10), 782-787.
29. Cooperberg, M. R., Cowan, J., Broering, J. M., & Carroll, P. R. (2008). High-risk prostate cancer in the United States, 1990–2007. *World journal of urology*, 26(3), 211-218.
30. Pepe, P., & Pennisi, M. (2015). Gleason score stratification according to age at diagnosis in 1028 men. *Contemporary Oncology*, 19(6), 471.
31. Carneseca, E. C., Mauad, E. C., de Araujo, M. A. A., Dalbó, R. M., Longatto Filho, A., & de Lima Vazquez, V. (2013). The Hospital de Câncer de Barretos Registry: an analysis of cancer survival at a single institution in Brazil over a 10-year period. *BMC Research Notes*, 6(1), 141.
32. Yeh, S. H., Chiu, C. M., Chen, C. L., Lu, S. F., Hsu, H. C., Chen, D. S., & Chen, P. J. (2007). Somatic mutations at the trinucleotide repeats of androgen receptor gene in male hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 120(8), 1610-1617.
33. Ferraldeschi, R., Welte, J., Luo, J., Attard, G., & de Bono, J. (2015). Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene*, 34(14), 1745–1757.
34. Palazzolo, I., Gliozzi, A., Rusmini, P., Sau, D., Crippa, V., Simonini, F., Ornesto, E., & Poletti, A. (2008). The role of the polyglutamine tract in androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3), 245-253.
35. Beilin, J., Ball, E. M., Favaloro, J. M., & Zajac, J. D. (2000). Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(1), 85-96.
36. Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, Moore NL, Raynor M, Neufing PJ, Coetzee GA, Tilley WD. (2004). Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Human Molecular Genetics*, 13(16), 1677-1692.
37. Harada, N., Mitani, T., Higashimura, Y., Yamaji, R., Okamoto, K., Nakano, Y., & Inui, H. (2010). Involvement of three glutamine tracts in human androgen receptor

- transactivation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1), 77-84.
38. Nelson, K. A., & Witte, J. S. (2002). Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer. *American Journal of Epidemiology*, 155(10), 883-890.
 39. Sun, J. H., & Lee, S. A. (2013). Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG) n repeat polymorphisms. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(5), 1195-1203.
 40. Weng H, Li S, Huang J-Y, et al. (2017). Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Scientific Reports*,7:40554.
 41. Li J, Mercer E, Gou X, Lu Y-J. (2013). Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes. *American Journal of Cancer Research*.;3(2):127-151.
 42. Ackerman, C. M., Lowe, L. P., Lee, H., Hayes, M. G., Dyer, A. R., Metzger, B. E. et al. (2012). Ethnic variation in allele distribution of the androgen receptor (AR)(CAG) n repeat. *Journal of Andrology*, 33(2), 210-215
 43. Balic, I., Graham, S. T., Troyer, D. A., Higgins, B. A., Pollock, B. H., Johnson-Pais, T. L. et al. (2002). Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in Hispanic men. *The Journal of Urology*, 168(5), 2245-2248.
 44. O'Brien, T. G., Guo, Y., Visvanathan, K., Sciulli, J., McLaine, M., Helzlsouer, K. J., & Watkins-Bruner, D. (2004). Differences in ornithine decarboxylase and androgen receptor allele frequencies among ethnic groups. *Molecular Carcinogenesis*, 41(2), 120-123.
 45. Gómez, R., Torres-Sánchez, L., Camacho-Mejorado, R. et al. (2016) Androgen receptor CAG polymorphism and sporadic and early-onset prostate cancer among Mexican men. *Journal of Human Genetics*, 61, 781-786.
 46. Tirabassi, G., Cignarelli, A., Perrini, S., delli Muti, N., Furlani, G., Gallo, M., & Balercia, G. (2015). Influence of CAG Repeat Polymorphism on the Targets of Testosterone Action. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 298107.
 47. Ryan, C. P., & Crespi, B. J. (2013). Androgen receptor polyglutamine repeat number: models of selection and disease susceptibility. *Evolutionary Applications*, 6(2), 180–196.

48. Butland, S. L., Devon, R. S., Huang, Y., Mead, C.-L., Meynert, A. M., Neal, S. J., ... Ouellette, B. F. (2007). CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC Genomics*, 8(1), 126.
49. Ramazzotti, M., Monsellier, E., Kamoun, C., Degl'Innocenti, D., & Melki, R. (2012). Polyglutamine repeats are associated to specific sequence biases that are conserved among eukaryotes. *PLoS One*, 7(2), e30824.
50. Li, H., Liu, J., Wu, K., & Chen, Y. (2012). Insight into role of selection in the evolution of polyglutamine tracts in humans. *PLoS One*, 7(7), e41167.
51. Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., ... Pääbo, S. (2010). A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5979), 710–722.
52. Choong, C. S., Kempainen, J. A., & Wilson, E. M. (1998). Evolution of the primate androgen receptor: a structural basis for disease. *Journal of Molecular Evolution*, 47(3), 334-342.

ANEXO

Tabla 1. Características de la población de estudio de acuerdo a casos y controles en línea germinal.

Característica	Casos n =14 (100%)	Controles n= 10 (100%)
Edad (años)		
Promedio	61.79 ± 7.54	57.80 ± 8.53
Rango	42-82	51-79
APE (ng/mL)		
Mínimo	0.6	0.6
Máximo	2054	3.29
Gleason		
7	2 (14.3)	
8	7 (50.0)	NA
9	4 (28.6)	
10	1 (7.1)	
Lugar de nacimiento ^a		
Ciudad de México	10 (71.4)	10 (100.0)
Centro	3 (21.4)	
Occidente	1 (7.1)	
IMC		
Normal	1 (7.1)	
Sobrepeso	9 (64.3)	NA
Obesidad	4 (28.6)	
Comorbilidad		
Ninguna	6 (42.9)	
DM2	3 (21.4)	NA
HTA	2 (14.3)	
Ambas	3 (21.4)	
Ex Fumador		
No	7 (50.0)	NA
Sí	7 (50.0)	
Invasión perineural		
No	2 (14.3)	NA
Sí	12 (85.7)	
Historia familiar de CaP		
No	8 (57.1)	NA
Sí	6 (42.9)	

^aLugar de nacimiento: Ciudad de México. **Centro:** Estado de México y Tlaxcala
Occidente: Guanajuato

Preparación de Buffer TBE (Electroforesis en gel)

1. Preparar solución stock de 0.5 M EDTA (500 mL)
 - Pesar 93.05 g EDTA.
 - Disolver en 20 mL de agua bidestilada.
 - Ajustar pH a 8. Emplear NaOH.
 - Ajustar el volumen a 500 mL con agua bidestilada

Nota: El bromuro de etidio es mutágeno y cancerígeno. Vista la ropa apropiada y la protección necesaria para su manipulación.

2. Preparar solución stock de Buffer 10X TBE (Tris/ácido bórico/EDTA)
 - Disolver 108 g de Tris en 55 g de ácido bórico en 900 mL de agua bidestilada
 - Adicionar 40 mL de 0.5M Na₂EDTA (pH 8.0) (alternativamente utilizar 9.3 g Na₂EDTA)
 - Ajustar el volumen a 1 L con agua bidestilada
 - Guardar a temperatura ambiente
3. Preparar solución de trabajo de Buffer TBE
 - Para electroforesis en gel, el TBE puede ser utilizada a una concentración de 0.5X (Dilución 1:10 de la solución stock). Diluir la solución stock 10X con agua bidestilada.

Solución stock de Bromuro de etidio 100 mL

- Para preparar soluciones stock de 10 mg/mL, pesar 1g de bromuro de etidio en 100 mL de agua bidestilada.
- Agitar vigorosamente hasta disolver completamente
- Preparar alícuotas, guarda en frascos o tubos ámbar, protegidos de la luz y a 4°C
- Para geles de agarosa, usar entre 0.5 y 1 µg por mL de solución de agarosa

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACIÓN DE PARTICIPACIÓN

1. Datos Generales

Investigador Principal:

Dr. Greco Hernández Ramírez

Teléfono: 56280433

Correo electrónico: ghernandezr@incan.edu.mx

Título del Proyecto: **Identificación de nuevos blancos terapéuticos y de detección para el cáncer de próstata en población mexicana.**

Versión del consentimiento: 2014

Sitio donde se realizará el estudio: INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.

2. Participación voluntaria.

Somos un equipo de médicos e investigadores del Instituto Nacional de Cancerología, y estamos investigando si en varones mexicanos hay ciertas mutaciones (cambios genéticos) en el Receptor de Andrógenos (RA) que se correlacionen con el desarrollo de cáncer de próstata. Esta investigación nos ayudará a sentar las bases para el desarrollo de posibles fármacos que detengan o ayuden a controlar esta enfermedad.

Su médico le ha diagnosticado un probable cáncer de próstata, por lo que le estamos invitando a participar en esta investigación para analizar cuales mutaciones en el Receptor de Andrógenos están presentes en pacientes mexicanos con cáncer de próstata. Se espera que participen 50 hombres con esta enfermedad, cuya participación es totalmente voluntaria. El negarse a participar no influirá en el tratamiento al que tiene derecho como paciente de la Institución. Así mismo, el paciente recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento. El investigador se compromete a proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar su voluntad para continuar participando.

3. Información para el Paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento.

Todos los tumores se desarrollan como resultado de cambios que se presentan en el material genético humano; estos cambios se llaman **mutaciones**. Las mutaciones pueden afectar la forma en que las células del cuerpo funcionan. El Receptor de Andrógenos es una molécula muy importante para el funcionamiento correcto de la próstata. Al parecer, las mutaciones en esta molécula alteran su función provocando el inicio y progresión al cáncer de próstata. En esta investigación estamos analizando si en varones mexicanos los tumores de próstata presentan algún tipo de mutaciones en el Receptor de Andrógenos. Esta información es muy relevante para desarrollar en el futuro algún tratamiento que funcione

mejor que los tratamientos actuales en el control del cáncer de próstata en varones mexicanos.

Le estamos invitando a participar en un estudio de investigación para evaluar las muestras de tumor obtenidas de Usted para poder estudiar posibles mutaciones en el RA, así como para analizar las características genéticas del tumor que usted desarrolló. Para este estudio se espera que participen 50 hombres mexicanos con probable diagnóstico de cáncer de próstata. Su participación es absolutamente voluntaria y no afectará su atención médica.

4. Datos propios del procedimiento: Toma de Biopsias.

Si Usted acepta participar en esta investigación, antes de iniciar el tratamiento le será tomada una muestra de tejido tumoral (biopsia) para un diagnóstico histopatológico. Una muestra adicional de tumor le será tomada para nuestra investigación. Este procedimiento es parte de las tomas de biopsias convencionales y necesarias para su diagnóstico, por lo que su participación en la Investigación no implica que Usted se someta a un procedimiento clínico adicional. Si ya usted cuenta con una muestra de tumor para el análisis de las mutaciones (es decir, la muestra que pudiera ya haber sido obtenida, probablemente de una biopsia que se realizó cuando se diagnosticó por primera vez el cáncer de próstata), no será necesario obtener otra, siempre y cuando su médico lo considere necesario. Las muestras de tejido normal serán obtenidas del Departamento de Patología del Instituto.

Posteriormente a la toma de las muestras, haremos determinados análisis para estudiar sus células tumorales. Dichos análisis no traerán consecuencias para Usted. Sólo servirán para la obtención de una descripción precisa de las características de su tumor.

Una vez realizados estos estudios, Usted recibirá su tratamiento con cirugía, radioterapia o bloqueo androgénico de rutina, mismo que se deriva de su diagnóstico y que no tiene relación con este estudio. Usted será valorado por un médico en cada visita y le serán evaluados los niveles del antígeno prostático específico (APE) para medir la respuesta a su tratamiento.

5. Beneficios.

Si Usted acepta participar en esta investigación, no recibirá un beneficio directo de los resultados de este estudio. Sin embargo, si participa en esta investigación podremos conocer cuáles son las mutaciones en el material genético que Usted presenta y si alguno de estos cambios podrían estar relacionados con la mejor respuesta a algún tratamiento en particular. Estos datos serán de utilidad en el futuro para poder establecer mejores métodos de tratamiento y de diagnóstico para los hombres mexicanos que desarrollan cáncer de próstata. Cualquier información derivada directa o indirectamente de esta investigación, le será informada.

La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control y la prevención de la enfermedad para otros pacientes.

6. Riesgos.

Este estudio no representa ningún riesgo para Usted. Los procedimientos antes mencionados son necesarios para poder realizar un análisis adecuado y preciso de los cambios en el material genético.

7. Procedimientos alternativos.

Si decide no participar, Usted seguirá con su tratamiento y atención en el Instituto de manera normal.

8. Responsabilidades del paciente.

Si Usted acepta participar en la investigación, Usted debe permitir la realización de la toma de las biopsias antes de iniciar el tratamiento. Es muy importante que cumpla también con el tratamiento recomendado por su médico. Usted ayudará mucho si le dice a su Médico cualquier molestia que presente durante los procedimientos.

9. Confidencialidad.

Sólo su Médico y los investigadores de este estudio sabrán que Usted está participando en el estudio. Los documentos que lo identifican a Usted serán confidenciales. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo, su Médico y los investigadores de este estudio podrán revisar su expediente clínico y/o los datos clínicos del estudio sin violar su confidencialidad como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, Usted no será identificado por el nombre.

10. Compensación.

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación.

11. Indemnizaciones y pago de eventos adversos.

Dado que en este estudio no hay riesgo de eventos adversos ni de prejuicios a su persona, este estudio no implica indemnizaciones ni tratamiento de ningún tipo.

12. Terminación del estudio.

Usted entiende que su participación en el estudio es voluntaria. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, sin que su tratamiento médico posterior se vea afectado. Su Médico también podrá detener el estudio por razones médicas u otras razones.

13. Personas a contactar.

En caso de dudas sobre su participación en este estudio, podrá contactar al Dr. Miguel Ángel Jiménez Ríos, Jefe del Departamento de Urología al teléfono 56 28 04 00. En caso de dudas sobre sus derechos como paciente que participa en un estudio clínico, contactar a la Presidenta del Comité de Ética en Investigación: Dra. Myrna Candelaria Hernández al teléfono: 562804 00 ext. 338

14. Firmas.

Del Paciente:

Yo _____
he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados con fines científicos, por lo que acepto participar en el estudio:
Identificación de nuevos blancos terapéuticos y de detección para el cáncer de próstata en población mexicana.

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma _____

Del Testigo 1:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Parentesco con el paciente: _____

Fecha: _____

Firma _____

Del Testigo 2:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Parentesco con el paciente: _____

Fecha: _____

Firma _____

Del Investigador o persona autorizada para la toma del consentimiento informado:

Nombre: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma _____

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, Avenida San Fernando No. 22, Ciudad de México, CP 14080; Teléfono: 56280400