TESIS DE DOCTORADO

VARIABILIDAD MOLECULAR DE GENES CANDIDATOS (MODULADORES DE LA APOPTOSIS Y EL CICLO CELULAR) Y SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR CÁNCER DE PRÓSTATA.

Nuria López Trigo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN DEL MEDIO NATURAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Dña. **Nuria López Trigo.**

Título de la tesis: **Variabilidad molecular de genes candidatos (moduladores de la apoptosis y el ciclo celular) y susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.

2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.

3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, a **11 de diciembre de 2020**.

Fdo. **Nuria López Trigo.**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D. **José Luis Blázquez Caeiro.**

En condición de**: Tutor y director.**

Título de la tesis: **Variabilidad molecular de genes candidatos (moduladores de la apoptosis y el ciclo celular) y susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña **Nuria López Trigo**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, a **11 de diciembre de 2020**

Fdo. **José Luis Blázquez Caeiro.**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. **Javier Rodríguez Luis.**

En condición de**: Director.**

Título de la tesis: **Variabilidad molecular de genes candidatos (moduladores de la apoptosis y el ciclo celular) y susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña **Nuria López Trigo**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, a **11 de diciembre de 2020**

Fdo. **Javier Rodríguez Luis.**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONFLICTO DE INTERÉS

Variabilidad molecular de genes candidatos (moduladores de la apoptosis y el ciclo celular) y susceptibilidad a desarrollar cáncer de próstata.

Dña. **Nuria López Trigo**

Declara que no existe ningún conflicto de interés en relación a esta Tesis Doctoral.

En **Santiago de Compostela**, a **11 de Diciembre de 2020**

Fdo. **Nuria López Trigo**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A Delfina.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"The dirty little secret of genomics is that we still know next to nothing about how a genome translates into the particularities of a living and breathing individual".

Svante Pääbo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar la gracias a mis dos directores de tesis, el Dr. José Luis Blázquez Caeiro y el Dr. Javier Rodríguez Luis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y ayudarme en todo momento para que, finalmente, esta tesis pudiese llegar a buen puerto.

A José Luis, por animarme a cambiar el mapa mental y ver las cosas desde otro punto de vista. Gracias por descubrirme a *Future Islands* y por hacer, de cada revisión, una experiencia diferente. De todas ellas he aprendido un poco, sin duda las recordaré con cariño.

A Javier, por allanarme el camino en tantos aspectos, por apoyarme en todo y, sobre todo, por escuchar todas las preguntas que se me han planteado. Gracias por tener una respuesta para mí y encontrar, siempre, las palabras adecuadas.

A todos los participantes del estudio, que han invertido un poquito de su tiempo para ayudar a arrojar algo más de luz en la etiología de esta enfermedad.

A Óscar y a Juan, por ayudarme con todos los trámites administrativos, con la dificultad añadida que supone hacer esto en tiempos de coronavirus. A Óscar, gracias por solucionar cada problema que se me ha presentado y transmitirme tranquilidad.

A Nerea, por haberse bebido mi licor de purpurina aún sabiendo a rayos. Gracias por estar siempre ahí, por haberme permitido conocerte y poder hablar contigo de cualquier cosa. Sin duda los días contigo en el departamento eran infinitamente más divertidos.

Ao aquelarre de meigas (Carla, Isa, Tamara, Julia), por hacerme desconectar como nadie. Por otros tantos conciertos, cenitas y charlas reparadoras en vuestra compañía. Gracias por ser tan especiales.

A Pablo, a mi Abe. No puedo describir con palabras todo lo que significas para mí. Gracias por estar conmigo, en las buenas y en las malísimas. Mi futuro está a tu lado. Te amo.

Y, por supuesto, a mi familia, por convertirme en la persona que soy. Sin vuestro apoyo incondicional no hubiera llegado hasta aquí. Esta tesis es por y para vosotros. A mi madre, por cada abrazo, por cada caricia, por ser siempre tan buena conmigo. Eres sensible, fuerte y te quiero. A mi padre, por transmitirme esa filosofía de vivir la vida al máximo y saber sacar algo bueno en todas las personas. Gracias por tanto, te quiero. A Ángela, o meu pequeno anxiño, gracias por revolucionar todo mi mundo. Espero que algún día puedas explicarle a mamá qué hacíamos a las tres de la madrugada arreglando las tablas de la tesis. Espero que a partir de ahora pueda dedicarte algo más, de todo el tiempo que te mereces. A mis abuelos, los que ya no están y los que todavía tienen fuerzas para luchar. De todos vosotros he sabido incorporar algo bueno en mi vida. A mi abuela Delfina, por tener una mentalidad adelantada a su tiempo, por cada sonrisa al llegar a casa, por conocerme mejor que nadie. Ojalá hubieras podido leer estas palabras. A todos vosotros, gracias.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN.

Se investiga la relación entre la variabilidad genética y el riesgo a desarrollar cáncer de próstata siguiendo un estudio de casos y controles a partir de 291 individuos diagnosticados de PCa (casos) y 249 individuos aparentemente sanos (controles), pertenecientes a la población de Galicia.

La diagnosis de los fenotipos moleculares se ha efectuado mediante estrategias de MALDI-TOF en plataformas de genotipado Sequenom, a partir de una batería de 19 SNPs, pertenecientes a genes candidatos estrechamente relacionados con la biología molecular de la carcinogénesis (*BCL2*, *CASP9*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP7*, *FAS*, *FASLG*, *BIRC5*, *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*). De los marcadores considerados, por primera vez se aborda el análisis, en cáncer de próstata, de un total de 7, correspondientes a los *loci CASP3*, *CASP7*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1A* y *CDKN1B*. Adicionalmente, se analizan dos marcadores inéditos en cáncer en el *locus FAS* (rs3740286, rs10509561).

A partir de la distribución de frecuencias genotípicas, la relación con el PCa ha sido abordada desde una perspectiva global, y sobre todo, a partir de análisis de estratificación en los que se ha hecho especial hincapié en la identificación de los intervalos de impacto y la optimización de tales intervalos.

De los resultados alcanzados, merece especial mención el impacto derivado de la variabilidad genética de los marcadores *FAS* (rs3740286), *FASLG* (rs763110), *MDM2* (rs937283) o *CASP7* (rs11196418), los cuales son de relevancia en la prognosis del PCa.

Palabras clave: estudio caso-control, cáncer de próstata, Galicia, marcador genético-molecular, apoptosis, ciclo celular.

RESUMO.

Investígase a relación entre a variabilidade xenética e o risco a desenvolver cancro de próstata seguindo un estudio de casos e controis a partir de 291 individuos diagnosticados de PCa (casos) e 249 individuos aparentemente sanos (controis), pertencentes á poboación de Galicia.

A diagnose dos fenotipos moleculares realizouse mediante estratexias de MALDI-TOF en plataformas de xenotipado Sequenom, a partir dunha batería de 19 SNPs, pertencentes a xenes candidatos estreitamente relacionados coa bioloxía molecular da carcinoxénese (*BCL2*, *CASP9*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP7*, *FAS*, *FASLG*, *BIRC5*, *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*). Dos marcadores considerados, abórdase por primera vez a análise, en cancro de próstata, dun total de 7, correspondentes aos *loci CASP3*, *CASP7*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1A* e *CKDN1B*. Adicionalmente, analízanse dous marcadores inéditos en cancro no *locus FAS* (rs3740286, rs10509561).

A partir da distribución de frecuencias xenotípicas, a relación co PCa foi abordada dende unha perspectiva global, e sobre todo, a partir de análises de estratificación nos que se fixo especial fincapé na identificación dos intervalos de impacto e a optimización de tales intervalos.

Dos resultados acadados, merece especial mención o impacto derivado da variabilidade xenética dos marcadores *FAS* (rs3740286), *FASLG* (rs763110), *MDM2* (rs937283) ou *CASP7* (rs11196418), os cales son de relevancia na prognose do PCa.

Palabras chave: estudio caso-control, cancro de próstata, Galicia, marcador xenético-molecular, apoptose, ciclo celular.

ABSTRACT.

The association between genetic variability and the risk of developing prostate cancer is investigated by means of a case-control study from 291 individuals diagnosed with PCa (cases) and 249 apparently healthy individuals (controls), belonging to the Galician population.

The diagnosis of molecular phenotypes has been carried out using MALDI-TOF strategies in Sequenom genotyping platforms, from a battery of 19 SNPs, belonging to candidate genes closely related to the molecular biology of carcinogenesis (*BCL2*, *CASP9*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP7*, *FAS*, *FASLG*, *BIRC5*, *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*). Seven of the markers analyzed, corresponding to the *loci CASP3*, *CASP7*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1A* and *CDKN1B*, are studied for the first time in prostate cancer. Additionally, two markers of *FAS locus* (rs3740286, rs10509561) are analyzed for the first time in cancer.

Based on the distribution of the genotype frequencies, the association with PCa has been approached from a global perspective, and above all, from stratificacion analysis in wich special emphasis has been placed on identifying the impact intervals and the optimization of such intervals.

Of the results achieved, special mention must be made of the impact derived from the genetic variability of *FAS* (rs3740286), *FASLG* (rs763110), *MDM2* (rs937283) or *CASP7* (rs11196418), wich are of relevance in the prognosis of PCa.

Key words: case-control study, prostate cancer, Galicia, molecular-genetic marker, apoptosis, cell cycle.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxi-ribonucleico.

Ag: Antígeno.

AICD: *Activation-induced cell death*; Muerte celular inducida por activación.

AIF: *Apoptosis-inducing factor.*

AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos.

AJCC: *American Joint Comittee on Cancer*.

Akt, PKB: *Protein kinase B.*

Ala, A: Alanina.

AMPK: *5´AMP-activated protein kinase.*

amu: *Atomic Masss Unit*; Unidad de Masa Atomica.

ANT: *Adenine nucleotide translocator;* Transportador de adenín nucleótido.

Apaf-1: *Apoptosis protease-activating factor-1*.

APE1: *Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*.

AR: *Androgen receptor*; Receptor de andrógenos.

Arg, R: Arginina.

AREs: *Androgen response elements*; Elementos de respuesta a andrógenos.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ASK1: *Apoptosis signal regulating kinase 1*.

Asp, D: Aspartato.

ASPP: *Apoptosis-stimulating protein of p53.*

ASR: *Age-standarized rate*.

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated protein*.

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related.*

ATP: *Adenosine triphosphate;* Adenosín trifosfato.

Bad, *BAD*: *Bcl-2-associated agonist of cell death*.

Bak, *BAK*: *Bcl-2 homologous antagonist killer*.

Bax, *BAX*: *Bcl-2-associated X protein.*

Bcl-2, *BCL2*: *B-cell lymphoma 2.*

Bcl2-$_{A1}$: *Bcl-2-related protein A1*.

Bcl-$_{XL}$: *B-cell lymphoma-extra large.*

Bcl-w, Bcl2l2: *Bcl-2 like protein 2*.

BER: *Base excision repair*.

Bid, *BID*: *BH3 interacting domain death agonist*.

Bim, *BIM*, Bcl2l11: *Bcl-2-like protein 11*.

BIR: *Baculoviral IAP repeat.*

BIRC5: *Baculoviral IAP repeat containing 5.*

BH: *Bcl-2 homology domain.*

Bmf, *BMF*: *Bcl-2-modifying factor.*

Bok, ***BOK***: *Bcl-2 related ovarian killer.*

BoxI BD: *Box I binding domain.*

BPDE: *Benzo(a)pyrene diol epoxide*.

BRCA2: *Breast cancer 2.*

C/EBPβ: *CAAT/enhancer binding protein β.*

CARD: *Caspase activation and recruitment domain.*

CASPASAs, CASP: *Cysteinyl aspartate-specific proteinases.*

CBP: *Cyclic AMP response element-binding protein.*

CD95, FAS: *Cell death 95*.

cdc2/CDK1*: Cell division control protein 1 homolog/ Cyclin-dependent kinase 1*.

CDE/CHR: *Cell-cycle dependent element/cell-cycle genes homology region.*

CDKs: *Cyclin dependent kinases;* Quinasas dependiente de ciclinas.

CDKN1A: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A.*

CDKN1B*: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B.*

CeGen: Centro Nacional de Genotipado.

CEPH: *Centre d´Etude du Polymorphism Humain*.

CHEK2: *Checkpoint kinase 2.*

Chk1*: Chekpoint kinase 1.*

Chk2*: Checkpoint kinase 2.*

CI, IC: *Confidence interval, Intervalo de confianza.*

CIP/KIP: *CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*.

CKIs: *Cyclin dependent kinase inhibitors*.

COX-2: *Ciclooxinegase 2*; Ciclooxigenasa-2.

CPC: *Chromosomal passenger complex*.

CRDs: *Cysteine rich domains*; Dominios ricos en cisteína.

CRM1: *Chromosome region maintenance 1*.

CrmA: *Cytokine response modifier A.*

CTCs: *Circulating tumor cells*; Célula tumorales circulantes.

CTLs: *Cytotoxic T lymphocyte*; Linfocitos T citotóxicos.

CZ: *Central zone of prostate*; Zona central de la próstata.

D´: Coeficiente de *Lewontin*.

Da: Dalton.

dATP: *Deoxyadenosine triphosphate*; Desoxiadenosina trifosfato.

DAXX: *Death domain associated protein*.

DD: *Death domain*; Dominio de muerte.

ddNTP: *dideoxynucleotide triphosphate*.

DDR: *DNA damage response*; Respuesta al daño en el ADN.

DED: *Death effector domain;* Dominio efector de muerte.

DHT: *Dihydrotestosterone*; Dihidrotestosterona.

DISC: *Death-inducing signaling complex*.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*.

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase*.

DNA-PKcs: *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*.

DNMT1: *DNA cytosine-5-methyltransferase 1*.

dNMP: *Deoxynucleoside monophospahte.*

dNTP: *Deoxynucleoside triphosphate*.

DR: *Death receptor*; Receptor de muerte.

DRE: *Digital rectal exam*; Exámen rectal digital.

DSB: *Double strand repair.*

ECIS: *European Cancer Information System.*

EDTA: *Ethylenediamenetetraacetic acid*.

EEUU: Estados Unidos.

EM: Esperanza-Maximización.

ETS: Enfermedad de transmisión sexual.

FADD: *Fas associated via death domain*.

FAS-AS1: *FAS Antisense RNA 1*.

FASL, ***FASLG***: *Fas ligand.*

FCF: Factor de crecimiento fibroblástico.

FLIP: *FLICE inhibitory protein.*

FOXO: *Forkhead box O proteins.*

FWD: *Forward*.

FZ: *Fibromuscular zone of prostate*; Zona fibromuscular de la próstata.

GADD45: *Growth arrest and DNA damage 45.*

GAS: *Gamma-interferon activation sequence*.

g.l.: grados de libertad.

gld: *generalized lymphoproliferative disorder*.

Gln, Q: Glutamina.

Glu, E: Ácido glutamico.

GSTP1: *Glutathione S-transferase P1*; Glutation S-transferasa P1.

h: Índice de heterocigosidad esperada.

$\hat{h}$: Índice de heterocigosidad esperada insesgada.

HBIXP: *Hepatitis B X-interacting protein.*

HDACs: *Histone deacetylases*; Histona desacetilasas.

HGPIN: *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia*; Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado.

HIF-1α: *Hypoxia-inducible factor 1-alpha.*

His, H: Histidina.

hnRNP: *Heterogeneous ribonucleoprotein particle*.

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna.

HPC1: *Hereditary prostate cancer 1*.

HPC2: *Hereditary prostate cancer 2.*

Hrk, *HRK*: *Harakiri*.

Hsp90: *Heat shock protein* 90.

IAPs: *Inhibitor of apoptosis proteins.*

IARC: *International Agency for Research on Cancer.*

iASPP: *Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53.*

ICAD/DFF-45: *Inhibitor caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor*.

IGF-1: *Insuline-like growth factor 1.*

IL-6: *Interleukin*-6.

Ile, I: Isoleucina.

IMC: Índice de Masa Corporal.

INCENP: *Inner centromere protein*; Proteína centromérica interna.

INDELs: *Small insertions and deletions.*

INF-ɣ*: Interferon gamma*.

iPLEX: *increased Plexing Efficiency and Flexibility.*

JAK/STAT: *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*.

KPC: *Kip ubiquitylation-promoting complex.*

LD, DL: *Linkage disequilibrium*; Desequilibrio de ligamiento.

LDL: *Low-density lipoprotein.*

LEDFG/p75: *Lens epithelium-derived growth factor/p75.*

Leu, L: Leucina.

LGPIN: *Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia*; Neoplasia intraepitelial prostática de bajo grado.

LOH: *Loss of heterocigosity*; Pérdida de heterocigosidad.

lpr: *lymphoproliferation*.

MACs: Moléculas de adhesión celular.

MAF: *Minor allele frequency*; Frecuencia del alelo menos común.

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight.*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase.*

Mcl1: *Myeloid cell leukemia sequence 1*.

MCM7: *Minichromosome maintenance-7*.

MDM2: *Mouse double minute-2 homolog*; *Murine doble minute 2.*

MDM4: *Mouse doble minute-4 homolog*; *Murine doble minute 4.*

MDMX: *Mouse doble minute-X homolog; Murine doble minute X.*

MGM: *Molecular genetic marker*, Marcador genético-molecular.

MHC-I: *Major histocompatibility complex class I.*

MIC1: *Macrophage inhibitory cytokine 1*.

MLKL: *Mixed lineage kinase domain like pseudokinase*.

MMR: *Mismatch repair.*

MOMP: *Mitochondrial outer membrane permeabilization*; Permeabilidad de la membrana mitoncodrial externa.

MPTPC: *Mitochondrial permeability transition pore*; Poro mitocondrial de permeabilidad transitoria.

mTOR: *Mammalian target of rapamycin.*

MSR1: *Macrophage scavenger receptor 1*.

Myc: *Myelocytomatosis*.

NAIP: *Neuronal apoptosis inhibitory protein.*

NER: *Nucleotide excision repair*.

NES: *Nuclear export signal*; Señal de exportación nuclear.

NF-kB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NHBE: *Normal human bronchial epitelial cells*; Células epiteliales bronquiales normales.

NK: *Natural killer*.

NLS: *Nuclear localization signal*; Señal de localización nuclear.

NNK: *Nicotine-derived nitrosamine ketone*.

NNN: *N-nitrosonornicotine.*

NO: *Nitric oxide.*

NOD: *Nucleotide-binding and oligomerization domain*.

NoLS: *Nucleolar localization signal*; Señal de localización nucleolar.

OR: *Odds Ratio*.

OGG1: *8-oxoguanine DNA glycosylase 1*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

p38^{JAB1}: p38 *Jun activation domain binding protein 1*.

p53AIP1: *p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*.

p53RE*: p53 response elements*; Elementos de respuesta al p53.

p90RSK1: *p90 ribosomal protein S6 kinases.*

PAH: *Polycyclic aromatic hydrocarbons*; Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

PAP: *Prostatic acid phosphatase*; Fosfatasa ácida prostática.

PARP: *Poly ADP-ribose polymerase*.

PBLs: *Peripheral blood lymphocyte*; Linfocitos en sangre periférica.

PCa: *Prostate cancer*; Cáncer de próstata.

PCD: *Programmed cell death*; Muerte celular programada.

PCR: *Polymerase chain reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa.

PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase-1*.

PGE_2: *Prostaglandin E2.*

PGR: *Periurethral glandular region of prostate*; Región glandular periuretral de la próstata.

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase.*

PIA: *Proliferative inflammatory atrophy*; Atrofia inflamatoria proliferativa.

PIN: *Prostatic intraepithelial neoplasia*; Neoplasia intraepitelial prostática.

PIP2: *Phosphatidylinositol biphosphate.*

PIP3: *Phosphatidylinositol triphosphate.*

PKC-δ: *Protein kinase C delta*.

PNCA: *Proliferating cell nuclear antigen*; Antígeno nuclear de proliferación celular.

PON1: *Paraoxonase 1*.

PSA: *Prostate specific antigen*; Antígeno prostático específico.

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue*.

Puma, *PUMA*: *p53 upregulated modulator of apoptosis*.

PY: *Pack-years.*

PZ: *Peripheral zone of prostate*; Zona periférica de la próstata.

r^2: Coeficiente de correlación.

RAIDD: *RIP-associated ICH/CED-3 homologous protein with a DD.*

Rb: *Retinoblastome*; Retinoblastoma.

RBM5: *RNA Binding Motif 5*.

REV: *Reverse*.

RING: *Really interesting new gene*.

RIP: *Receptor-interacting protein*.

RIPK: *Receptor interacting protein kinases.*

RNA: *Ribonucleic Acid*.

RNS: *Reactive nitrogen species*; Especies reactivas de oxígeno.

ROCK-1: *Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1*.

ROS: *Reactive oxygen species*; Especies Reactivas de Oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

RR: *Relative Risk.*

rs: *reference site*.

RSK: *Ribosomal s6 kinase.*

RTK: *Receptor tyrosine kinase*; Receptor tirosín kinasa.

SAP: *Shrimp Alkaline Phosphatase*.

SAPK: *Stress-activated protein kinase.*

SAPK/JNK: *Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase.*

SBE: *Single Base Extension*.

SCF^{SKP2}: *Skp, cullin, F-box containg complex.*

s.e.: *Standard error*; Error estándar.

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

sFAS: *Soluble FAS.*

sFASL: *Soluble FASL*.

SGK: *Serum and glucocorticoid-inducle kinase.*

SI: Sistema inmunitario.

SKP2: S-*phase kinase-associated protein 2.*

SMAC/DIABLO: *Second mitochondria-derived activator of caspases*/ *Direct IAP binding protein with low pl*.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo de un solo nucleótido.

SOD: *Superoxide dismutase*; Superóxido dismutasa.

SPF45: *Splicing factor 45*.

SRD5A2: *3-oxo-5α-steroid 4-dehydrogenase 2.*

SREBPs: *Sterol regulatory element-binding proteins.*

STRE: *Stress response element*; Elemento de respuesta al estrés.

STAT1: *Signal transducer and activator of transcription 1*.

STR: *Short Tandem Repeat;* Repeticiones en tándem cortas.

SV40: *Simian virus* 40.

TAD: *Transactivation domain*; Dominio de transactivación.

tBID: *truncated BID.*

TCR: *T-cell receptor*; Receptor de linfocitos T.

THD: *TNF homology domain*; Dominio de homología con TNF.

Thr, T: Treonina.

TILs: *Tumor-infiltrating lymphocytes*; Linfocitos de infiltración tumoral.

TNF: *Tumor necrosis factor*; Factor de necrosis tumoral.

TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*; Receptor de factor de necrosis tumoral.

TNM: *Tumor, nodes, metastasis*.

TM: *Transmembrane domain*; Dominio de membrana.

TP53: *Tumor protein 53*.

TRADD: *TNF receptor type 1-associated death domain protein*.

TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*.

TRAIL: *TNF-related apoptosis inducing ligand*.

TRAILR: *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*.

TRUS: *Transrectal ultrasound*.

Tyr, Y: Tirosina.

TZ: *Transitional zone of prostate*; Zona de transición de la próstata.

UTR: *Untranslated region*.

Val, V: Valina.

VDAC: *Voltage-dependent anion channel;* Canal aniónico dependiente de voltaje.

VDR*: Vitamin D receptor.*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*; Factor de crecimiento endotelial vascular.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPH: Virus del papiloma humano.

WAT: *White adipose tissue*; Tejido adiposo blanco.

WDR: *WD40 repeat domain.*

WHO: *World Health Organization*.

WT1: *Wilms Tumor 1 protein*.

XIAP: *X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein.*

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN……..37

1.1. GENERALIDADES DE LA PRÓSTATA……..……37
1.1.1. Características anatómicas y ubicación……..……...37
1.1.2. Función biológica……..……40
1.1.3. Alteraciones patológicas…….…..41

1.2. CARCINOGENÉSIS PROSTÁTICA……...42
1.2.1. Generalidades…….……42
1.2.1.1. Lesiones histológicas precursoras……...42
1.2.1.2. Carcinogénesis……43
1.2.1.3. Estadificación del carcinoma prostático……45
1.2.1.3.1. *Gradación histológica: escala de Gleason*……..…46
1.2.1.3.2. *Sistema de clasificación TNM*……..…47
1.2.1.3.3. *Grupos pronósticos: etapas*……..…48

1.2.2. Epidemiología……..……49
1.2.2.1. Incidencia……49
1.2.2.2. Mortalidad……...50
1.2.2.3. Prevalencia……..51

1.2.3. Factores de riesgo…….……53
1.2.3.1. Factores demográficos……..…53
1.2.3.1.1. *Edad*……...…53
1.2.3.1.2. *Grupo poblacional y variaciones geográficas*.....54

1.2.3.2. Factores hormonales…….……...55
1.2.3.2.1. *Andrógenos*……..……55
1.2.3.2.2. *Leptina*.....56
1.2.3.2.3. *Otras hormonas*……..…..56

1.2.3.3. Inflamación crónica…….……56

1.2.3.4. Estrés oxidativo……...56

1.2.3.5. Índice de masa corporal (IMC)……...57

1.2.3.6. Comportamiento y estilo de vida: factores ambientales……..…57
1.2.3.6.1. *Dieta*……...…57
1.2.3.6.2. *Tabaquismo*……..…59
1.2.3.6.3. *Exposiciones ocupacionales y ambientales*……...…59
1.2.3.6.4. *Actividad sexual y vasectomía*……...…60

1.2.3.7. Quimioprevención……...60

1.2.3.8. Factores genéticos……...60
1.2.3.8.1. *Antecedentes familiares*…….60
1.2.3.8.2. *Variaciones del genoma humano*……..…61

1.3. APOPTOSIS…….…….62
1.3.1. Cambios morfológicos celulares……..…...….62
1.3.2. Función de la apoptosis y trastornos asociados……..……..63
1.3.3. Relación con el cáncer……..…64
1.3.3.1. Relación con el PCa……66

1.4. MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES……..……...67
1.4.1. Familia Bcl-2…….……...67
1.4.1.1. Bcl-2……68

1.4.2. Familia caspasas……..……..74
1.4.2.1. Caspasa-9……77
1.4.2.2. Caspasa-8……81
1.4.2.3. Caspasa-3 y caspasa-7……....…….85

1.4.3. Fas-Fasl……..……...93

1.4.4. Familia IAPs……..……104
1.4.4.1. Survivina (*BIRC5*)……104

1.4.5. p53 y MDM2…….……112

1.4.6. Marcadores del ciclo celular……..……124
1.4.6.1. p21 (*CDKN1A*)……..125
1.4.6.2. p27 (*CDKN1B*)……..131

2. OBJETIVOS.....139

3. HIPÓTESIS DE PARTIDA……..139

4. MATERIAL Y MÉTODOS……..143

4.1. MUESTRA DE ESTUDIO……..143
4.1.1. Área de estudio y criterios de selección…….……143
4.1.2. Criterios bioéticos……..….144
4.1.3. Cuestionarios…….….144

4.2. MUESTRA BIOLÓGICA……...144
4.2.1. Extracción de ADN……..……...145
4.2.1.1. Fenol-Cloroformo-Isoamílico……...145
4.2.1.2. *MasterPure*……....146
4.2.1.3. *JetQuick*.....147

4.3. GENOTIPADO……...149

4.4. ÁNALISIS ESTADÍSTICO……158
4.4.1. Frecuencias alélicas y genotípicas……..……158

4.4.2. Análisis de equilibrio genético…….……..158

4.4.3. Índice de heterocigosidad…….……..159

4.4.4. Estadístico t_s……..……..160

4.4.5. Cálculo de riesgo relativo……..……160
4.4.5.1. *Odds Ratio*……161
4.4.5.1.1. *Modelos genéticos*……...….162
4.4.5.2. Cálculo de la significación estadística……..164
4.4.5.2.1. *Intervalos de Confianza (95%)*……...….164
4.4.5.2.2. *Test* χ^2……...…164

4.4.6. Análisis de estratificación por variables……..……...165
4.4.6.1. Variables analizadas…….…166
4.4.6.1.1. *Edad*……..…..166
4.4.6.1.2. *Índice de masa corporal*…….....166
4.4.6.1.3. *Tabaquismo*…….....167
4.4.6.2. Análisis de estratificación……...…….……167

4.4.7. Análisis de interacción gen-gen…….……167
4.4.7.1. Desequilibrio de ligamiento (LD) y haplotipos……..…168
4.4.7.2. Análisis de interacciones genotípicas……...170

5. RESULTADOS Y DISCUSION……173

5.1. *BCL2* (rs2279115)……...174

5.2. *CASP9* (rs1052576)…….179

5.3. *CASP8* (rs1045485)…….185

5.4. *CASP3* Y *CASP7*…….190

5.4.1. rs1049216 (*CASP3*)……....190
5.4.2. rs4647603 (*CASP3*)……....194
5.4.3. rs1049216-rs2705897-rs4647603 (*CASP3*)……....199
5.4.4. rs11196418 (CASP7)……..…202

5.5. *FAS-FASLG*……..…207
5.5.1. rs1800682 (*FAS*)……..…207
5.5.2. rs3740286 (*FAS*)……..…212
5.5.3. rs10509561 (*FAS*)……...218
5.5.4. rs763110 (*FASLG*)……..…223
5.5.5. rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*)……..228
5.5.6. rs1800682 (FAS)-rs3740286 (FAS)-rs10509561 (*FAS*)-rs763110 (*FASLG*)……..……230

5.6. *BIRC5*……..233
5.6.1. rs8073961 (*BIRC5*)……..…...233
5.6.2. rs9904341 (*BIRC5*)……..…237
5.6.3. rs8073061-rs9904341 (BIRC5)……..….244

5.7. *TP53* Y *MDM2*……247
5.7.1. rs1042522 (*TP53*)……..….247
5.7.2. rs2279744 (*MDM2*)……....252
5.7.3. rs937283 (*MDM2*)……..257
5.7.4. rs937283-rs2279744 (*MDM2*)……....262
5.7.5. rs937283 (*MDM2*)-rs2279744 (*MDM2*)-rs1042522 (*TP53*)……..….264

5.8. *CDKN1A* (rs2395655)……266

5.9. *CDKN1B*……..……271
5.9.1. rs34330 (*CDKN1B*)……..…...271
5.9.2. rs2066827 (*CDKN1B*)……....276
5.9.3. rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*)……..….282

5.10. COMBINACIONES GENOTÍPICAS ENTRE MARCADORES……..…..285

5.11. DISCUSIÓN GENERAL……..……295

6. CONCLUSIONES……309

7. REFERENCIAS……313

8. ANEXOS.....351

8.1. ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.....351
8.2. ANEXO 2. PERFIL GENÉTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA. HOJA DE CUESTIONARIO.....353

ÍNDICE DE TABLAS.....355

ÍNDICE DE FIGURAS.....361

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1. GENERALIDADES DE LA PRÓSTATA.

1.1.1. Características anatómicas y ubicación.

La próstata es una glándula sexual accesoria del sistema reproductor masculino que se desarrolla alrededor de la parte inicial de la uretra. Está presente en todos los mamíferos aunque presenta una considerable variación en anatomía, bioquímica y patologías. Se dispone inmediatamente por debajo de la vejiga, por delante del recto, por detrás de la sínfisis del pubis y por encima del diafragma urogenital. Mide alrededor de 2 cm de espesor, 3 cm de largo y 4 cm de ancho, mientras que su peso en condiciones no patológicas oscila entre los 20 y los 25 gramos. La próstata está constituida por una base, un vértice y cuatro caras: anterior, posterior y dos laterales (García-Porrero & Hurié, 2005; Latarjet, Liard & Pró, 2004; Lippert, 2010; Ross & Pawlina, 2016; Wein, Kavousi, Novick, Partin & Peters, 2008).

- La *base* de la próstata, cara superior o superficie amplia, está divida en una región anterior y una posterior. La región anterior está en contacto con la vejiga urinaria y atravesada por la uretra, mientras que en la región posterior penetran los conductos eyaculadores y las vesículas seminales.
- El *vértice* de la próstata, cara inferior o superficie estrecha, está atravesado por la salida de la uretra y contacta con el diafragma urogenital.
- La *cara posterior* es ancha en la parte superior y se va estrechando de manera progresiva hacia abajo. Está en contacto con el recto, de modo que es aplanada y se corresponde con la cara palpable durante el tacto rectal.
- Las *caras inferolaterales* son convexas, inclinadas hacia abajo y se relacionan con la fascia pelviana y el músculo elevador del ano.
- La *cara anterior* es redondeada, está orientada hacia la sínfisis del pubis y resulta de la unión de las dos caras inferolaterales por delante de la uretra. En esta cara se encuentra el istmo de la próstata, formado por tejido fibromuscular.

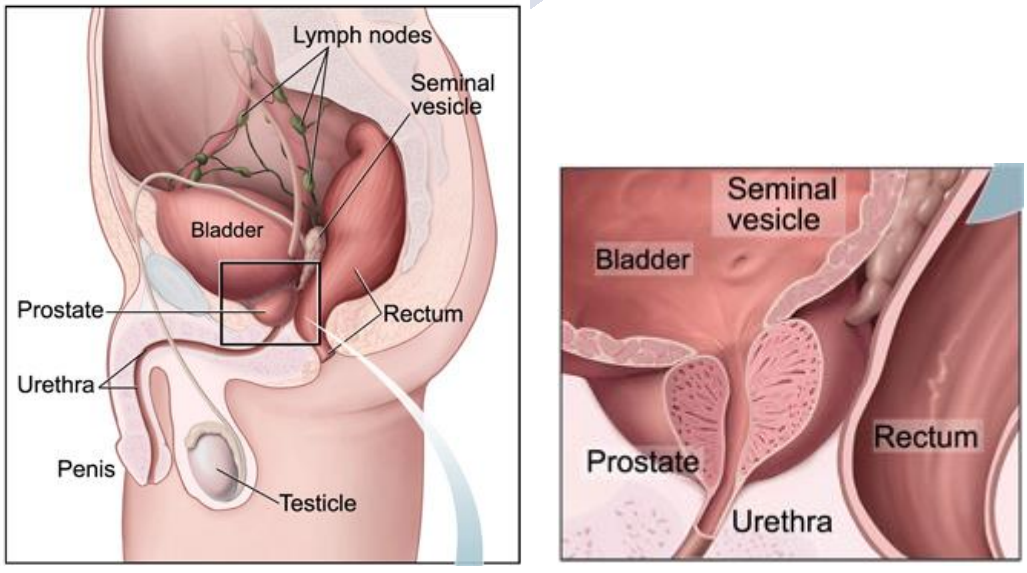

Figura 1. Aparato genitourinario masculino (izquierda) y glándula prostática (derecha). Tomada de *National Cancer Institute*.

La próstata es un órgano andrógeno-dependiente que se forma en el seno urogenital del embrión, por evaginaciones del epitelio uretral. En la niñez, el tejido glandular prostático solo se compone de los sistemas de conductos, pero al llegar a la pubertad sufre una rápida hiperplasia con formación de los alvéolos o acinos y la próstata duplica su tamaño. Este rápido crecimiento se debe a la estimulación de la testosterona secretada por las células de *Leydig* (Brüel, Christensen, Qvortup, Tranum-Jensen & Geneser, 2014; García-Porrero & Hurié, 2005; Lippert, 2010; Wein *et al*., 2008).

Histológicamente, la próstata está constituida por dos tercios de tejido glandular, las *glándulas prostáticas*, las cuales están unidas por un tercio de tejido fibromuscular, el *estroma mioelástico* y rodeadas por una capa de tejido conectivo conocido como *cápsula prostática.* Separando las células epiteliales de las estromales se encuentra una capa de tejido conjuntivo conocida como *lámina propia* o *membrana basal* (Fig. 2).

-*Glándulas prostáticas o parénquima*. Son unas 40-50 glándulas tubuloalveolares que se vacían en unos 15-25 conductos excretores independientes, los cuales a su vez desembocan en la uretra prostática, a ambos lados del colículo seminal. La pared de las glándulas o epitelio glandular es desde cúbico a columnar y está formado por cuatro tipos de células diferentes: epiteliales secretoras, neuroendocrinas, amplificadoras transitorias y basales.

- Las *células epiteliales secretoras* son las más abundantes, tienen morfología columnar o cilíndrica alta y se disponen en hileras: apoyadas unas al lado de las otras y conectadas por moléculas de adhesión celular. Se distinguen fácilmente porque en la base celular se sitúa el núcleo mientras que en la parte superior aparecen gránulos de secreción y enzimas. Además, la membrana plasmática de la cara apical, dispuesta hacia el lumen, posee microvellosidades. Son andrógeno-dependientes, ya que expresan el receptor androgénico (AR), y son responsables tanto de la producción como de la secreción del líquido prostático. Para ello, forman un anillo alrededor del acino, hacia el que producen las secreciones, que drenan a los conductos conectados a la uretra.

- Las *células neuroendrocrinas* residen de forma dispersa entre las células epiteliales secretoras. Su papel biológico no está claro, aunque es posible que modulen el crecimiento, diferenciación y actividad secretora del epitelio prostático mediante control paracrino y autocrino. Su función reguladora la llevan a cabo por medio de la secreción de polipéptidos hormonales y aminas biogénicas como la serotonina o la somatostatina.

- Las *células amplificadoras transitorias* están ubicadas en la capa basal del compartimento epitelial y representan tipos celulares intermedios entre las células madre indiferenciadas y las células del tejido prostático. Presentan capacidad pluripotencial ya que surgen a raíz de una célula madre, se dividen en la capa basal y una fracción de ellas se diferencia y se desplaza hacia la capa epitelial luminal secretora. Aunque inicialmente son andrógeno-independientes, a medida que se van diferenciando van adquiriendo capacidad de expresión de numerosos marcadores bioquímicos como el receptor de andrógenos o de proteínas del líquido seminal como la fosfatasa ácida prostática (PAP) o el antígeno prostático específico (PSA).

- Las *células basales* son pequeñas, aplanadas y de morfología cúbica. Son poco abundantes, representando menos del 10% de la cantidad total de células. Descansan sobre la membrana basal, como cuña entre las bases de las células epiteliales cilíndricas adyacentes. Es probable que el compartimento de las células basales sea la fuente de las células madre epiteliales de la próstata, ya que son relativamente indiferenciadas, tienen bajo índice de proliferación, son independientes de andrógenos y carecen casi por completo de productos de secreción como PSA o PAP. De acuerdo con la necesidad de recambio celular para el mantenimiento del tejido prostático, se piensa que estas células madre pluripotenciales del epitelio basal dan origen a una jerarquía de células progenitoras destinadas a diferenciarse en células secretoras o neuroendocrinas.

-*Estroma mioelástico*. Aparece formado por tejido conectivo rico en fibras elásticas y fibras musculares lisas abundantes que se entremezclan con las glándulas. La contracción de estas fibras permite la rápida expulsión del semen durante la eyaculación.

-*Cápsula prostática* o *anatómica*. Es una fina capa de tejido conectivo que rodea la próstata como a la mayoría de los órganos parenquimatosos.

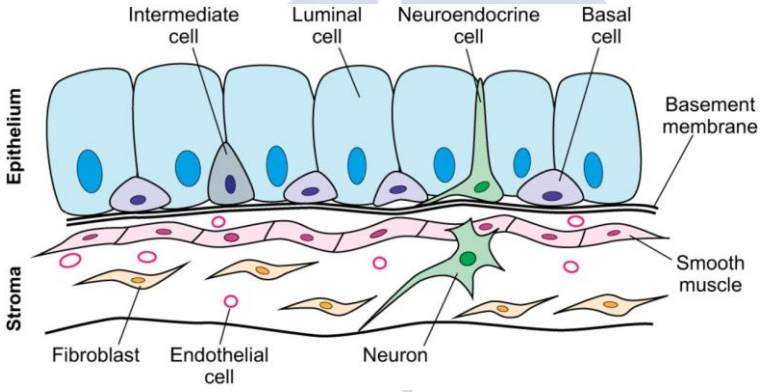

Figura 2. Tipos celulares de la próstata. Tomada de Toivanen & Shen, 2017 con permiso de The Company of Biologists Ltd.

La próstata puede dividirse en lóbulos, desde un punto de vista anatómico, o en zonas, desde un punto de vista clínico (Fig. 3).

- *División anatómica*. Las estructuras que atraviesan la próstata (uretra prostática, conductos eyaculadores, utrículo prostático) permiten su división en cinco lóbulos: medio, posterior, laterales e istmo. El *lóbulo posterior* está ubicado detrás de la uretra y por debajo de los conductos eyaculadores. El *lóbulo medio* está localizado entre los dos conductos eyaculadores y la uretra. Los *lóbulos lateral derecho* e *izquierdo* se sitúan a ambos lados de la uretra y constituyen la mayor parte de la próstata. Finalmente, el *istmo prostático* o *lóbulo anterior* es fibromuscular, prácticamente aglandular, y se forma por la unión de los lóbulos laterales por delante de la uretra (García-Porrero & Hurié, 2005; Latarjet *et al*., 2004; Lippert, 2010).

- *División clínica*. De acuerdo con las patologías de la próstata, este órgano se divide en cuatro zonas prostáticas que se distribuyen de forma concéntrica: zona periférica, zona central, zona de transición y zona periuretral. La *zona central* contiene el 25% del tejido glandular,

rodea los conductos eyaculadores y no presenta ocurrencia de cáncer de próstata ni de inflamación. La *zona periférica* rodea la zona central y ocupa la parte posterior y laterales de la glándula, limitando con la cápsula anatómica, es más gruesa y forma el 70% del tejido glandular. Es la zona de mayor frecuencia de tumores malignos, esto es, carcinoma prostático (PCa), así como de inflamación, pero hay ausencia de hiperplasia benigna de próstata (HPB). La *zona de transición* rodea la uretra prostática, supone el 5% del volumen glandular y es donde ocurren frecuentemente las hiperplasias benignas de la próstata, y, de forma poco frecuente, el carcinoma. Existe, además, una pequeña zona de glándulas periuretrales (<1% del volumen glandular final), las cuales pueden sufrir proliferación patológica en etapas avanzadas de HPB. Junto con estas zonas glandulares, se diferencia una zona de estroma fibromuscular, situada en la superficie anterior de la próstata, por delante de la uretra (De Marzo *et al*., 2007; Ross & Pawlina, 2016).

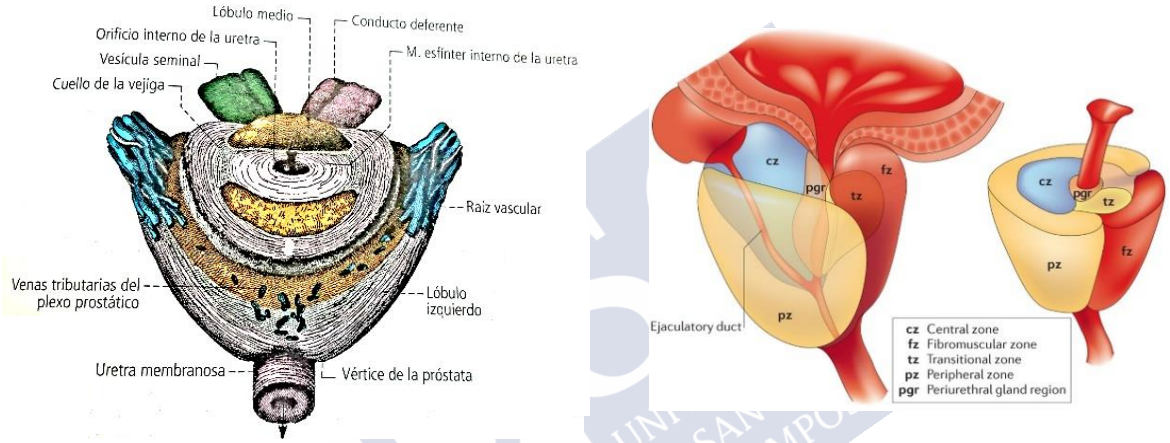

Figura 3. División de la próstata en lóbulos (izquierda) o en zonas (derecha). Tomadas de De Marzo *et al*., 2007 con permiso de Springer Nature y Latarjet *et al*., 2004 con autorización de Editorial Médica Panamericana.

1.1.2. Función biológica.

La principal función de la próstata es la producción de una parte del líquido o plasma seminal, aproximadamente el 20% del volumen final. La mayor contribución al plasma seminal proviene de las vesículas seminales, y el volumen restante procede de las glándulas de *Cowper* y de *Littré*. Las glándulas prostáticas se encargan de la secreción, mientras que la contracción de las fibras musculares lisas permite su rápida expulsión a la uretra durante la eyaculación, formando la primera porción del semen eyaculado. Esta secreción se almacena en los alvéolos de las glándulas hasta el momento de la eyaculación y puede concentrarse en forma de masas amorfas conocidas como cuerpos de almidón o depósitos de amiloide, que incluso pueden llegar a calcificarse dando lugar a cálculos prostáticos (Brüel *et al*., 2014; Lippert, 2010; Ross & Pawlina, 2016; Wein *et al*., 2008).

La secreción prostática es un líquido lechoso, poco denso y alcalino (*p*H= 7,29), que contiene principalmente fosfatasa ácida prostática, fibronolisina, ácido cítrico y antígeno prostático específico. Se piensa que influye en la fertilidad masculina, ya que incrementa la motilidad, la supervivencia y el transporte de los espermatozoides. Presenta, además, un efecto bacteriostático por medio de la secreción de iones de zinc o espermina, los cuales favorecen un

medio hostil para el desarrollo de patógenos (Brüel *et al*., 2014; Lippert, 2010; Ross & Pawlina, 2016; Wein *et al*., 2008).

-El *antígeno prostático específico* (PSA) es una glucoproteína de 33 kDa que actúa como serinaproteasa y que se encuentra exclusivamente en las células epiteliales de la próstata. Su principal función es impedir la solidificación del esperma. Las concentraciones séricas de PSA se usan como marcador tumoral de PCa, tanto de presencia como de progresión. En condiciones normales, la mayor parte del PSA es expulsado e incorporado en el líquido seminal, quedando en circulación sanguínea una cantidad muy pequeña (<4 ng/ml). No obstante, en un hombre que padece PCa, el epitelio prostático transformado produce una cantidad muy elevada de PSA, lo que se traducirá en un aumento de la concentración de PSA en el torrente sanguíneo. Una concentración de 4-10 ng/ml indicaría un 25% de riesgo de cáncer, mientras que con concentraciones superiores a 10 ng/ml el riesgo aumentaría hasta el 67%.

-La *fosfatasa ácida prostática* (PAP) es una enzima de 100 kDa que regula la proliferación celular y el metabolismo del epitelio glandular prostático. Se han encontrado concentraciones séricas elevadas de PAP en pacientes con metástasis de PCa, por lo que esta enzima se utiliza como marcador pronóstico de cáncer.

La próstata es estimulada en su crecimiento, mantenimiento y función secretora por la presencia de ciertas hormonas sexuales y factores de crecimiento. La principal hormona es la testosterona, sintetizada por las células de *Leydig* en los testículos. Solamente la testosterona que circula libre o no fijada a proteínas, aproximadamente un 2%, puede ser captada e introducida en la próstata por difusión. Una vez dentro de la célula, la testosterona es convertida de forma irreversible en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5α-reductasa tipo II. La DHT es un andrógeno mucho más potente y activo que la testosterona, presentando mayor afinidad por el receptor de andrógenos (AR). La unión de la DHT al AR produce en el mismo un cambio conformacional, permitiendo su activación y paso desde el citosol al núcleo de la célula. Una vez en el núcleo, los dímeros fosforilados de AR se unen a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (AREs). Estos AREs están situados en regiones promotoras génicas, de modo que su activación aumenta la transcripción de genes involucrados en la síntesis del ADN y la proliferación celular. Por consiguiente, la DHT aparece implicada tanto en la proliferación y diferenciación del epitelio prostático normal, como en el crecimiento de la HPB y el PCa dependiente de andrógenos (Ross & Pawlina, 2016).

1.1.3. Alteraciones patológicas.

La próstata es pequeña e inactiva hasta la pubertad, momento a partir del cual, bajo efecto de la testosterona, experimenta una rápida fase de crecimiento. Alcanza su culminación alrededor de los 20 años, siendo firme y elástica, y permanece estable hasta los 45-50 años. A partir de esa edad se produce una progresiva disminución de la testosterona y la próstata sufre una involución fibrosa que conduce a la atrofia: la cápsula se engruesa y aumenta el depósito amiloide en las glándulas pudiendo aparecer calcificaciones. Puede ser, entonces, asiento de neoformaciones benignas (hipertrofia prostática benigna) o malignas (cáncer de próstata) que obstaculizan la micción. Se sabe que la aparición de patologías prostáticas es resultado de la pérdida del equilibrio entre los procesos de proliferación celular y muerte celular programada o apoptosis (*American Cancer Society;* García-Porrero & Hurié, 2005; Latarjet *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008).

- *Hiperplasia prostática benigna* (HPB). Es una enfermedad típica de individuos de edad avanzada, ya que la padecen el 75% de los varones mayores de 60 años y el 90% de los mayores de 80. La HPB ocurre cuando aumenta o se hipertrofia la zona de transición de la próstata, pudiendo alcanzar también la zona periuretral. El crecimiento puede ser difuso o formando un tumor benigno conocido como adenoma prostático. Se trata de una patología benigna, que no produce metástasis ni se propaga a otros órganos y que es consecuencia de la edad, ya que el órgano prostático no deja de aumentar a lo largo de la vida. No obstante, pueden producirse ciertas complicaciones debido a que el agrandamiento prostático comprime la uretra, provocando trastornos de micción tales como la nicturia, la polaquiuria o la disuria. Si la vejiga no se vacía por completo puede originarse incluso cistitis o pielonefritis. La aparición de los primeros síntomas depende más de la dirección en que crece el tumor que del tamaño del mismo, de modo que en algunos casos pueden tardarse años o hasta décadas en detectarse. Puesto que la HPB no se detecta en varones castrados, se piensa que su origen es debido a una hiper-actividad de la enzima 5α-reductasa, generando el aumento de los productos de transformación de la testosterona, tales como la dihidrotestosterona. Estos andrógenos podrían estimular la producción de factores de crecimiento por parte de las células glandulares, los cuales a su vez inhibirían la muerte celular programada o apoptosis de las células, desembocando en la atrofia o proliferación incontrolada de las células epiteliales prostáticas (Brüel *et al*., 2014; García-Porrero & Hurié, 2005; Lippert, 2010).

-*Prostatitis.* Esta patología se refiere a la inflamación de la próstata, que puede ser aguda, crónica y no infecciosa. La prostatitis aguda y crónica está causada por microorganismos, generalmente bacterias, mientras que la no infecciosa presenta etiología desconocida. La sintomatología varía en función de si la causa es infecciosa o no, pero en general cursa con dolor, trastornos miccionales, sexuales y perineales, así como fiebre y escalofríos en caso de infección aguda (Serrano, 2003).

-*Cáncer de próstata* (PCa). Por su interés en el presente estudio, esta patología se describirá con detalle en el siguiente apartado.

1.2. CARCINOGÉNESIS PROSTÁTICA.

1.2.1. Generalidades.

1.2.1.1. Lesiones histológicas precursoras.

Existen dos lesiones histológicas de la próstata que se consideran precursoras del carcinoma prostático: la *atrofia inflamatoria proliferativa* (PIA) y la *neoplasia intraepitelial prostática* (PIN) (Fig. 4) (Benedetti-Padrón & Reyes, 2014; DeVita, Lawrence & Rosenberg, 2008; Wein *et al*., 2008).

-*Atrofia inflamatoria proliferativa (PIA).* Considerada la precursora de PIN, la PIA consiste en un espectro de lesiones caracterizadas por la yuxtaposición de un epitelio atrófico a un infiltrado inflamatorio. Contiene células epiteliales con altas tasas de proliferación, entre la normal y la PIN, en áreas con inflamación crónica. La PIA sería una lesión regenerativa que aparece como consecuencia de una infección o un traumatismo celular que proviene del daño oxidativo, la hipoxia o la autoinmunidad, y que en su estado hiperproliferativo lleva al cáncer. Histológicamente, las células luminales en la PIA tienen escaso citoplasma, núcleo central pequeño y nucléolo no evidente, pero la línea de células basales y la membrana basal conservan

su integridad. Suele estar localizada en la zona periférica, contigua a la PIN o incluso al adenocarcinoma prostático. Los pacientes con PIA tienen un 20% de incidencia de cáncer de próstata en los 5 años siguientes a su diagnóstico comparado con un 6% de incidencia en pacientes sin PIA.

-*Neoplasia intraepitelial prostática (PIN).* Se trata de una lesión histológica caracterizada por la hiperplasia epitelial luminal, la atipia nuclear y la desorganización de la arquitectura celular. A diferencia del cáncer, no cursa con la afectación de la membrana basal. Aunque se produce una reducción del número y tamaño de las células basales, éstas no desaparecen como en el caso del carcinoma. Puede ser de bajo grado, si la atipia es mínima y no aparecen nucléolos prominentes, o bien de alto grado, si los núcleos son grandes, con variaciones de tamaño y aparecen nucléolos prominentes. Solo la PIN de alto grado representa una lesión precursora del carcinoma prostático, aunque su presencia no es indispensable para la aparición de cáncer. Se ha visto que el hallazgo de una PIN en una biopsia implica un 30-50% de riesgo de hallazgo de cáncer en una biopsia posterior.

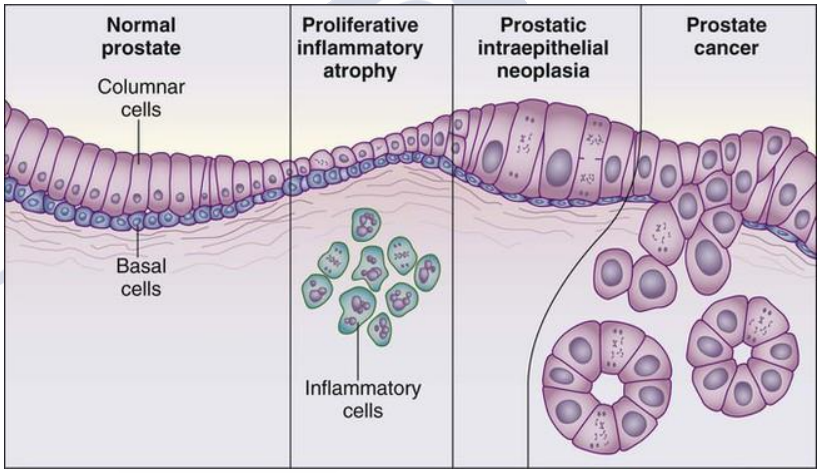

Figura 4. Progresión histológica del carcinoma prostático desde lesiones precursoras. Tomada de Nelson, Carter, DeWeese, Antonarakis & Eisenberg, 2015 con permiso de Elsevier.

1.2.1.2. Carcinogénesis.

La *carcinogénesis* u *oncogénesis* se define como el proceso por el cual se produce el cáncer, esto es, el proceso de transformación de una célula normal en cancerosa o maligna. Igual que ocurre con el resto de carcinomas, la progresión desde formas preneoplásicas hasta un cáncer de próstata clínicamente evidente es el resultado de la acumulación progresiva de una serie de *alteraciones genéticas y epigenéticas* en *genes reguladores del cáncer,* es decir, protooncogenes y genes supresores tumorales. Los productos proteicos codificados por los protooncogenes promueven el crecimiento y la división celular, mientras que los codificados por los supresores tumorales detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño en el ADN y favorecen el proceso de muerte celular programada o apoptosis. De este modo, los protooncogenes favorecen el proceso carcinogénico y los supresores tumorales lo detienen (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

Según la hipótesis de *Knudson*, para que un *supresor tumoral* participe en el proceso carcinogénico tendría que sufrir una mutación inactivante, es decir, de pérdida de función, y para eliminar su actividad tendrían que estar mutados o inactivos ambos alelos: si una de las mutaciones ya viene determinada en la línea germinal por medio de predisposición genética (*first hit*) sería suficiente otro evento mutacional (*second hit*) en la línea somática de la próstata para desarrollar la enfermedad. Estos individuos serían heterocigotos para este gen en línea germinal, pero homocigotos en línea somática. Si la mutación no aparece en la línea germinal, es decir, en cánceres esporádicos, serían necesarias dos mutaciones en la línea somática para que se inicie el proceso tumorigénico. Dado que son necesarios dos eventos mutacionales (*doble hit*) para que se inactive el gen, a los genes supresores tumorales se les conoce como genes recesivos. La pérdida de función de un gen supresor tumoral se produce, por lo tanto, cuando el individuo pierde ambas copias del alelo funcional. El fenómeno por el cual un individuo se vuelve homocigoto, esto es, la pérdida de heterocigosidad o pérdida de un alelo, equivale al segundo *hit* en la hipótesis de *Knudson* y se conoce como LOH (*loss of heterocigosity*) (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

Los genes supresores tumorales pueden subdividirse en *gatekeepers* (guardianes) y *caretakers* (cuidadores). Los *gatekeepers* implican a los genes supresores tumorales tradicionales que, en sus formas normales, regulan directamente el crecimiento del tumor al actuar como inhibidores de la proliferación celular o como promotores de la apoptosis. Por otra parte, los *caretakers* son genes implicados en la reparación del ADN y en el mantenimiento de la integridad del genoma, cuya pérdida de función permite la acumulación de mutaciones en genes supresores tumorales *gatekeepers* o en protooncogenes. Estas dos categorías se distinguen según el número de mutaciones necesarias para la formación del tumor. Así, tras la mutación heredada de un *gatekeeper* solo se precisa de una segunda mutación somática para que el tumor se inicie. Sin embargo, para que se inicie el tumor tras la mutación heredada de un alelo en un gen *caretaker* son necesarias varias mutaciones somáticas: la mutación del segundo alelo del gen *caretaker* y la mutación de ambos alelos de un *gatekeeper* o del alelo de un protooncogén (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

La participación de los *protooncogenes* en el proceso carcinogénico es diferente, siendo necesaria solo una mutación que los active de forma permanente, esto es, con ganancia de función, por lo que se conocen como genes dominantes. De este modo, la mutación en uno solo de los alelos sería suficiente para su transformación en oncogenes o generadores del cáncer. Las alteraciones que activan oncogenes en la línea germinal son raras debido a su carácter dominante en la formación de tumores, pudiendo presentar efectos letales en fetos que hereden este tipo mutaciones, impidiendo su subsistencia (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

Para que una célula se convierta en cancerosa se cree que serían necesarios un mínimo de 6 eventos mutacionales en estos genes reguladores del cáncer. Cuando esto ocurre, se produce un desequilibrio de la homeostasis entre la división celular y la apoptosis, dando lugar a una proliferación descontrolada de células que forman una masa anormal de tejido conocida como *cáncer*. Por lo tanto, en el crecimiento tumoral contribuyen tanto un aumento en la proliferación celular como una disminución de la apoptosis, lo que hace que la muerte de las células sea

inferior al surgimiento de nuevos clones celulares (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

Además de la acumulación de lesiones genéticas, el cáncer aparece definido por otras características: origen clonal, crecimiento autónomo incontrolado, metástasis y destrucción del huésped. Se considera que tiene un *origen clonal*, en el que todas las células cancerosas se producen a partir de una sola célula que ha sufrido una mutación inicial. A medida que prolifera, este conjunto de células descendientes clonales irá adquiriendo la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que le permitirán evadir los puntos de control celular y la apoptosis, ofreciéndole una ventaja selectiva frente al resto de células. Con la progresión tumoral, el linaje de la célula cancerosa original puede diversificarse debido a la adquisición de mutaciones distintas, dando lugar a numerosos subclones de células *genéticamente diferentes*, hecho que complica el tratamiento del cáncer. Para permitir el crecimiento del tumor primario, las células cancerígenas tienen una expresión más alta de la enzima telomerasa, que les permite alargar indefinidamente los telómeros y evitar la *senescencia celular*. Las necesidades crecientes del tumor en expansión (nutrientes y oxígeno) se suplen por medio de la creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, fenómeno conocido como *angiogénesis* (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

Otra de las características de las células cancerígenas es su capacidad de abandonar su ubicación original, entrar en la circulación sanguínea o linfática y colonizar otros tejidos. Esta capacidad invasora de las células malignas se conoce como *metástasis* o formación de tumores secundarios, los cuales poseen las mismas características que el primario, y produce pérdida de función del órgano afectado, siendo responsable de la mayoría de las muertes por cáncer (90%). La capacidad de invadir que poseen las células malignas implica la *pérdida de adherencia* entre células vecinas y célula-matriz extracelular, debido a mutaciones en las moléculas de adhesion celular (MACs). Una vez que las células destruyen la membrana basal y atraviesan la circulación linfática o sanguínea formando CTCs (celulas tumorales circulantes) pueden instalarse, sobrevivir y proliferar en nuevos tejidos. Puede ser que estas células no consigan sobrevivir en el nuevo ambiente o que lo hagan por un período breve de tiempo, dando lugar a una *micrometástasis* que termina por desaparecer (Alberts *et al*., 2016; García-Foncillas, 2003; Ortiz, 2006).

1.2.1.3. Estadificación del carcinoma prostático.

La inmensa mayoría (90-95%) de carcinomas prostáticos son *adenocarcinomas acinares*, es decir, originados en el epitelio glandular de los acinos o alvéolos, sobre todo de la zona periférica. Como consecuencia, prácticamente la totalidad de los estudios acerca del estadio, pronóstico y tratamiento se refieren exclusivamente a este tipo de tumores. No obstante, existen otras variantes histológicas poco frecuentes del PCa: adenocarcinoma ductal, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma endometrioide, carcinoma neuroendocrino, carcinoma de células en anillo de sello o carcinoma transicional (Cortés-Funes & Colomer-Bosch, 2010; Grignon, 2004; Picazo, 1996).

El proceso completo del cáncer de próstata, desde la aparición de una lesión preneoplásica hasta las lesiones metastásicas, puede durar decenios. La sintomatología en el cáncer de próstata no suele surgir hasta que la enfermedad está en un estadio avanzado y es similar a la encontrada en una HPB: disuria, tenesmo vesical, polaquiuria, nicturia, retención de orina, goteo y hematuria terminal. Es por ello que el diagnóstico del adenocarcinoma prostático se basa principalmente en anomalías del examen rectal digital (DRE) o en el aumento del nivel sérico de PSA. Si estas pruebas indican la posibilidad de un cáncer, el diagnóstico es confirmado por medio de biopsia con aguja guiada por ultrasonido transrectal (TRUS). Una vez diagnosticado, se utilizan sistemas de clasificación tumoral por etapas o estadios con el objetivo de determinar la extensión de la enfermedad, evaluar el pronóstico y guiar, finalmente, las recomendaciones terapéuticas. Los sistemas de estadificación más usados en la actualidad para el adenocarcinoma prostático son la escala de *Gleason* y el sistema TNM (Longo *et al*., 2012; Wein *et al*., 2008).

1.2.1.3.1. *Gradación histológica: escala de Gleason.*

La escala de *Gleason* es el sistema más utilizado de gradación histológica del adenocarcinoma prostático, presentando un gran valor pronóstico de la enfermedad. Este sistema valora la agresividad o comportamiento del tumor en función del grado de diferenciación nuclear y el patrón de crecimiento en el estroma prostático. Puesto que se trata de un cáncer heterogéneo, el índice final se obtiene del sumatorio de las puntuaciones numéricas obtenidas de dos biopsias prostáticas. La primera puntuación define el patrón tumoral predominante, mientras que la segunda se refiere al segundo patrón más frecuente. A estos patrones estructurales se les asigna un grado del 1 al 5, desde glándulas muy diferenciadas hasta pobremente diferenciadas, respectivamente (Fig. 5) (Cortes-Funés & Colomer-Bosch, 2010; Gleason, 1992; Wein *et al*., 2008).

Los tumores con *patrón de Gleason 1* están bien diferenciados y son similares a tejidos prostáticos normales. Se componen de glándulas redondeadas pequeñas, bien formadas, uniformes, únicas, con bordes bien definidos y estrechamente unidas entre sí. *El patrón de Gleason 2* es similar al 1 pero las glándulas son más alargadas, tienen un borde menos definido y guardan una relación menos estrecha, indicando un crecimiento del estroma. Los tumores con *patrón 3 de Gleason* presentan una variación marcada de tamaño y forma, con glándulas más oscuras y pequeñas que las observadas en patrones anteriores. Algunas de estas células presentan un patrón infiltrante. Las glándulas con *patrón 4 de Gleason* no son únicas y aisladas como las observadas en los patrones 1-3, sino que forman grupos neoplásicos dispuestos en cordones que invaden el tejido circundante. Se distinguen glándulas grandes, irregulares y cribiformes, caracterizando un tumor poco diferenciado y asociado a un pronóstico mucho peor que el 3. Finalmente, el tumor con *patrón 5 de Gleason*, con epitelios cribiformes y papilares, no muestra diferenciación glandular y está compuesto por láminas sólidas, cordones, células aisladas o nidos tumorales sólidos con necrosis central. Se correspondería con un tumor muy poco diferenciado o anaplásico.

La suma final de las dos puntuaciones de *Gleason* puede variar de 2 (tumor bien diferenciado) a 10 (tumor escasamente diferenciado). Una puntuación final situada entre 2 y 6 indicaría un tumor de crecimiento lento, escasa agresividad y pronóstico favorable. Por el

contrario una puntuación entre 8 y 10 sería reflejo de un cáncer muy agresivo, de rápido crecimiento y diseminación, teniendo como resultado un pronóstico peor. Un valor de 7 indicaría una agresividad intermedia, existiendo diferencias entre las puntuaciones 4+3 y 3+4, de peor y mejor pronóstico respectivamente.

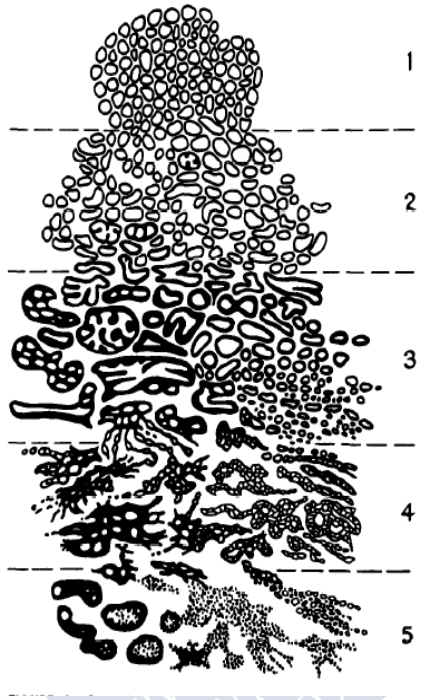

Figura 5. Sistema de gradación histológica de *Gleason*. Tomada de Gleason, 1992 con permiso de Elsevier.

1.2.1.3.2. *Sistema de clasificación TNM.*

El sistema de estadificación para el cáncer de próstata más utilizado es el TNM (*tumor, nodes, metastasis*), establecido por la asociación *American Joint Comittee on Cancer* (AJCC). En este sistema se valora el tamaño y la extensión del tumor principal o primario (T), la invasión tumoral a ganglios linfáticos o nódulos cercanos (N) o la existencia de metástasis (M). Para su determinación se tienen en cuenta resultados tanto del tacto rectal como de la ecografía por imágenes, para una valoración externa e interna de la próstata. De este modo se establecen categorías para los tumores malignos que no son palpables en el tacto rectal (T1), los identificables sólo por antígeno prostático específico anormal (T1c), los palpables pero clínicamente circunscritos a la glándula (T2) y para los tumores que ya se han extendido fuera de la próstata (T3 y T4) (Tabla 1) (*American Cancer Society;* Cortés-Funes & Colomer-Bosch, 2010; Longo *et al*., 2012).

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM (AJCC, 1992).

CÁNCER INCIDENTAL	
Tx	No puede valorarse el tumor primario.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
T1	Tumor subclínico: no es palpable ni visible en imágenes.
T1a	Hallazgo histopatológico incidental en ≤5% del tejido extirpado en la resecación transuretral, no palpable y con grado histológico de *Gleason* <7.
T1b	Hallazgo histopatológico incidental en >5% del tejido extirpado, con grado histológico de *Gleason* >7.
T1c	Tumor identificado por biopsia con aguja debido a una elevación en el PSA.
CÁNCER ORGANO-CONFINADO	
T2	Tumor confinado a la próstata, palpable.
T2a	Afectación de menos de la mitad de un lóbulo.
T2b	Afectación de más de la mitad de un lóbulo pero no ambos lóbulos.
T2c	Afectación de ambos lóbulos.
CÁNCER LOCALMENTE AVANZADO	
T3	El tumor se expande a través de la cápsula prostática.
T3a	Extensión extracapsular, unilateral o bilateral.
T3b	Invasión de las vesículas seminales.
	Cáncer localmente invasor.
T4	Invasión de estructuras vecinas como cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores y/o fijación a la pelvis.
AFECTACIÓN GANGLIONAR REGIONAL	
Nx	Los ganglios linfáticos no pueden ser evaluados.
N0	Sin evidencia de metástasis ganglionares.
N1	Metástasis en ganglio linfático regional único; ≤2 cm de dimensión.
N2	Metástasis única (>2 pero ≤5 cm) o múltiples con ninguna >5 cm.
N3	Metástasis en ganglio linfático regional >5 cm de dimensión.
ENFERMEDAD METASTÁSICA	
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
M0	Sin evidencias de metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.
M1a	Afectación de ganglios linfáticos no regionales.
M1b	Metástasis óseas.
M1c	Afectación de otras localizaciones a distancia.

1.2.1.3.3. *Grupos pronósticos: etapas.*

La agrupación de las categorías TNM, la gradación de *Gleason* y el nivel de PSA permite la obtención de diferentes etapas o grupos pronósticos en el cáncer de próstata. Estas etapas son numeradas del I al IV, aumentando de forma proporcional a la propagación tumoral.

La *etapa I* es un estadio inicial del cáncer que se caracteriza por un crecimiento lento y que ocupa menos de la mitad de un lóbulo de la próstata (T1-T2a). Generalmente no es palpable por tacto rectal, presenta niveles bajos de PSA (<10) y las glándulas están bien diferenciadas

(*Gleason* ≤ 6). En la *etapa II* el cáncer se encuentra confinado a la próstata y puede subdividirse en estadios A o B. En el estadio IIA la masa tumoral no llega a afectar ambos lóbulos (T1-T2b), los niveles de PSA son medios (<20) y el grado de *Gleason* igual o inferior a 7. En el estadio IIB el tumor puede llegar a afectar ambos lóbulos (T1-2c), los niveles de PSA son altos (≥20) y la puntuación de *Gleason* superior a 7. La *etapa III* se caracteriza por la expansión del tumor fuera de la próstata con afectación de las vesículas seminales (T3). En la *etapa IV* pueden distinguirse varios subestadios: en un primer momento el tumor se propaga a estructuras adyacentes a la próstata, tales como el esfínter uretral, el recto, la vejiga o la pared pélvica (T4); a continuación la propagación afecta a los nódulos linfáticos regionales (N1), mientras que en el estadio más avanzado se ha extendido a otras partes del cuerpo afectando a los ganglios linfáticos distales, los huesos o/y órganos diversos (M1) (*American Cancer Society*).

1.2.2. Epidemiología.

1.2.2.1. Incidencia.

La *incidencia* se define como el número de nuevos casos de cáncer que ocurren en una población o área geográfica determinada durante un período de tiempo específico. Suele expresarse como el número absoluto de nuevos casos por año o por medio de una tasa de incidencia que enuncia el número de nuevos casos por 100.000 personas/año (*International Agency for Research on Cancer*).

El cáncer de próstata es el segundo más frecuente en hombres a nivel mundial con cerca de 1,3 millones (1.276.106) de nuevos casos diagnosticados en el año 2018, solo precedido por el cáncer de pulmón (2.093.876). El PCa parece impactar de forma diferente en las distintas regiones mundiales, siendo más frecuente en poblaciones desarrolladas. Las tasas de incidencia son mayores en Australia/Nueva Zelanda, Norte y Oeste de Europa (Noruega, Suecia, Irlanda), Norte de América (EEUU principalmente), Caribe y Sur de África. Por el contrario, las regiones asiáticas son las que presentan las tasas de incidencia más bajas (Fig. 6). La adopción del PSA como método de diagnóstico precoz en países más desarrollados, cierta predisposición genética vista en individuos de ascendencia africana como afroamericanos o habitantes del Caribe, así como el papel de la occidentalización en el estilo de vida, son factores que podrían contribuir a explicar parte de las diferencias observadas entre distintas poblaciones (Bray *et al*., 2018).

En Europa, el carcinoma prostático ha emergido como el tumor más frecuente en hombres, con 450.000 nuevos casos en el año 2018. Las tasas de incidencia de este cáncer varían más de 5 veces entre distintos países, siendo más elevadas en el Norte y Oeste de Europa, destacando países como Irlanda, Estonia, Noruega o Francia, mientras que las más bajas se encuentran en países del Centro-Este y Sur europeo como Rumanía, Ucrania o Albania (Fig. 7). (Ferlay *et al*., 2018).

En el año 2018 España presentó una incidencia ligeramente superior a la media de la Unión Europea, con 104,2 nuevos casos por 100.000 personas, siendo el tercer país del Sur europeo con mayor incidencia, solo precedido por Eslovenia y Chipre (Fig. 7) (Ferlay *et al*., 2018). Al igual que en muchos países occidentales, la incidencia aumentó drásticamente desde principios de los años 90 a causa de la introducción y generalización del uso del PSA, así como a un

aumento en la esperanza de vida de la población, llegando a un total de 31.728 nuevos casos diagnosticados en el año 2018 (Asociación Española Contra el Cáncer; *GLOBOCAN, 2018*).

La incidencia del cáncer de próstata muestra una distribución heterogénea en los distintos registros españoles. Las tasas ajustadas a la población europea en las zonas de mayor incidencia, Girona y País Vasco, con más de 110 casos por 100.000 habitantes son 1,67 veces superiores a las de Granada, con 66 casos por 100.000 habitantes (López-Abente, Núñez, Pérez-Gómez, Aragonés & Pollán, 2015). Resultados procedentes de la Sociedad Española de Urología indican que la incidencia de PCa en Galicia podría ser una de las más altas de toda España, alcanzando una tasa de 143 casos por 100.000 varones, lo que supone una media de 1.900 nuevos casos cada año solo en nuestra Comunidad Autónoma (Sousa, Salgues & Grupo de Estudio Breogan, 2006).

1.2.2.2. Mortalidad.

La *mortalidad* se define como el número de muertes por cáncer que ocurren en una población o área geográfica determinada durante un período de tiempo específico. Al igual que la incidencia, puede expresarse como el número absoluto de muertes en un año o como el número de muertes por 100.000 personas/año (*IARC*).

Con una estimación de 359.000 muertes en todo el mundo durante el año 2018, el cáncer de próstata es la quinta causa de muerte por cáncer en hombres, precedido por el de pulmón, el de hígado, el de estómago y el colorrectal. Las variaciones en las tasas de mortalidad mundiales son inferiores que las de incidencia, aunque suelen ser mayores en regiones menos desarrolladas. Las tasas de mortalidad han disminuido notablemente en muchas regiones, tales como el Norte de América, especialmente EEUU, Oceanía, Norte-Oeste de Europa y países desarrollados de Asia. Por el contrario, siguen siendo elevadas en poblaciones Negroides como África Subsahariana o el Caribe, América del Sur y Central o el Centro-Este de Europa. Las razones de los recientes descensos en las tasas de mortalidad por PCa en los países de mayores recursos son, probablemente, debido a los avances en el tratamiento, así como a la mayor detección de la enfermedad en una etapa más temprana a través de la prueba del PSA (Fig. 6) (Bray *et al*., 2018).

En Europa, el cáncer de próstata ocupa el tercer puesto en mortalidad por cáncer, precedido por el de pulmón y el colorrectal, con un total de 107.000 muertes en el año 2018. Los países del Norte de Europa parecen ser los que presentan una tasa de mortalidad mayor, llegando a tasas de 37,3 o 35,7 fallecimientos por 100.000 personas en Estonia y Letonia, respectivamente. Por el contrario, las más bajas se encuentran en países del Sur europeo, con una tasa de 10,7 defunciones por 100.000 en Italia (Fig. 7) (Ferlay *et al*., 2018).

La mortalidad por carcinoma prostático en España es de las más bajas del continente europeo, con un total de 5.793 fallecimientos en el año 2018, lo que supone una tasa estandariza ajustada a la población europea de 13,2 defunciones por 100.000 habitantes (Fig. 7) (Ferlay *et al*., 2018). Aunque no se observa un patrón geográfico claro, las tasas más elevadas de mortalidad parecen situarse en regiones norteñas como Asturias, el País Vasco o Galicia. En la mayoría de las comunidades autónomas españolas se produjo un descenso de la mortalidad en

la última década (López-Abente *et al*., 2015). La comunidad autónoma de Galicia ha sufrido un descenso notable de la mortalidad, pasando de ocupar el primer puesto en el período 2002-2006, con una tasa de mortalidad ajustada a la europea de 23 casos por 100.000 habitantes, a ocupar el tercer puesto en el quinquenio 2008-2012, con una tasa de 18,69 muertes por 100.000 (Cabanes, Pérez-Gómez, Aragonés, Pollan-Santamaria & López-Abente, 2009; López-Abente *et al*., 2015).

1.2.2.3. Prevalencia.

La *prevalencia* se refiere al número de individuos que han recibido el diagnóstico de cáncer en una población determinada y que continúan vivos después de 1, 3 o 5 años. Es, por lo tanto, el número total de población afectada por cáncer, que incluye tanto diagnósticos recientes como antiguos, y se expresa en número absoluto o como una proporción por 100.000 habitantes. La prevalencia está proporcionalmente relacionada con la supervivencia, de modo que tumores con baja supervivencia tendrán menor prevalencia aunque se diagnostiquen más frecuentemente (*IARC*; Sociedad Española de Oncología Médica).

Las tendencias divergentes en incidencia y mortalidad para el carcinoma prostático hacen que sea el tumor más prevalente en hombres a nivel mundial, con una prevalencia a 5 años de 3.724.658 individuos, de los cuales más del 40% serían europeos. Las regiones con un mayor número de individuos conviviendo con PCa son países del Norte Europeo, como Irlanda (439,3), Noruega (381,6) o Suecia (350,4), o bien del Oeste Europeo como Francia (331,9). La prevalencia también es elevada en Australia/Nueva Zelanda (293,8/309,4), EEUU (253,9) o países del Sur de Europa como España (239,7) o Italia (208,9) (Fig. 8) (*GLOBOCAN, 2018*).

Según estimaciones procedentes de la SEOM para el año 2017, la prevalencia a 5 años del cáncer de próstata en España serían un total de 101.781 individuos afectados. En Europa, los pacientes con carcinoma prostático diagnosticados entre los años 2000-2007 tuvieron una tasa de supervivencia a 5 años estandarizada por edad mayor del 80% en todos los países, excepto en los del Este Europeo, llegando al 85% en población española (López-Abente *et al*., 2015; Trama *et al*., 2015).

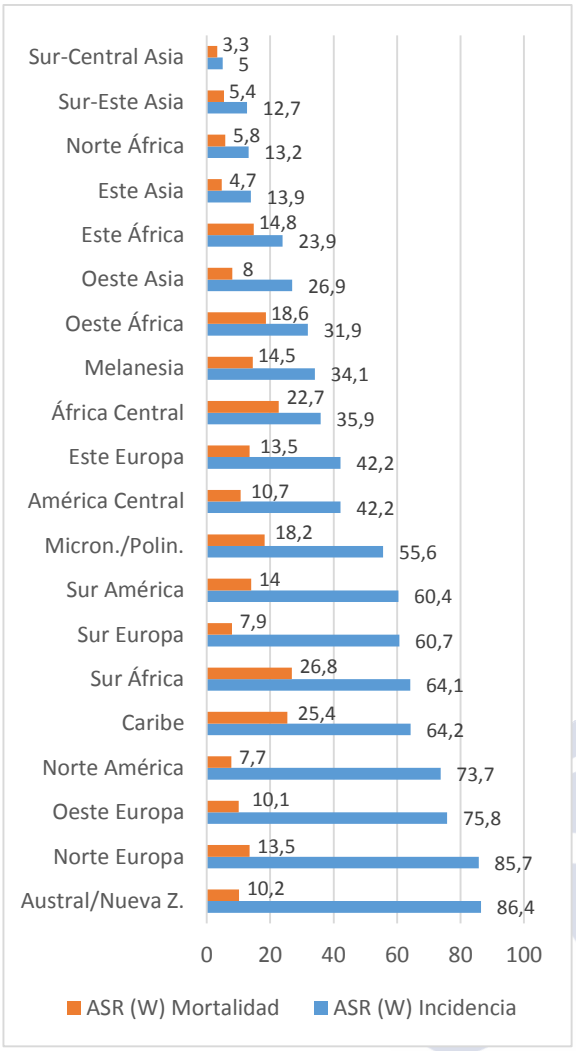

Figura 6. Tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad a la población mundial por 100.000 personas/año. ASR: *Age-Standarized Rate*. Basada en *GLOBOCAN, IARC, 2018.*

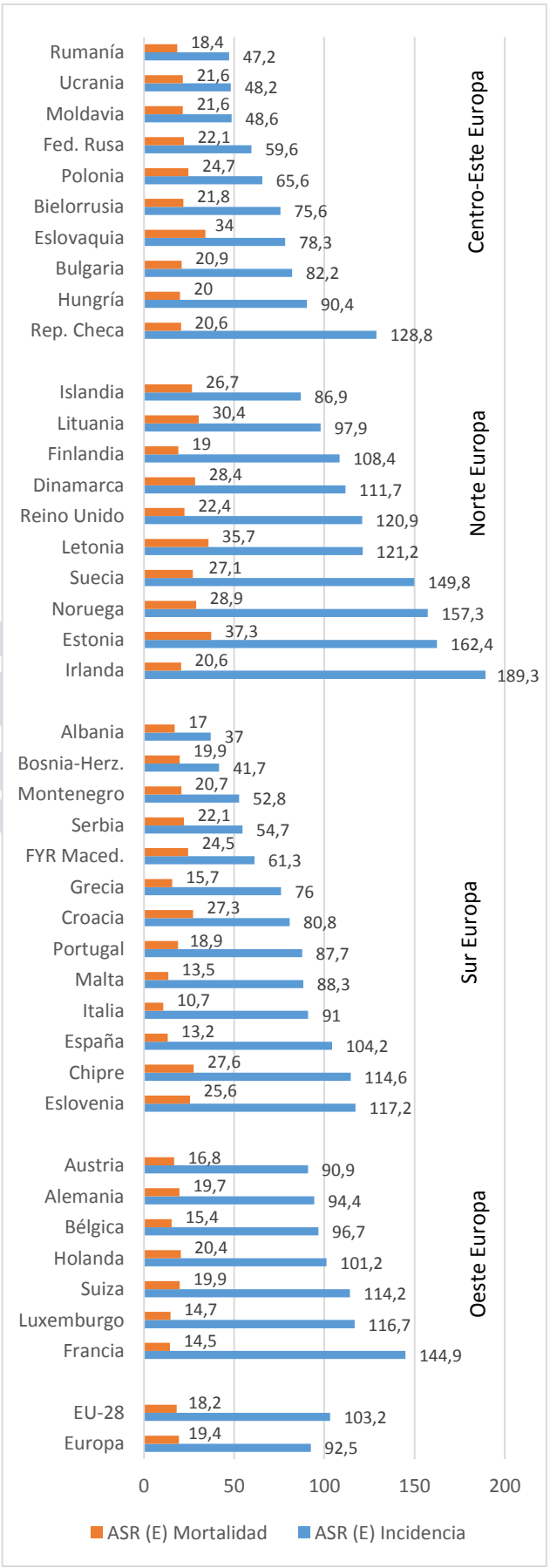

Figura 7. Tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad a la población europea por 100.000 personas/año. ASR: *Age-Standarized Rate*. Basada en Ferlay *et al.*, 2018; ECIS, 2018.

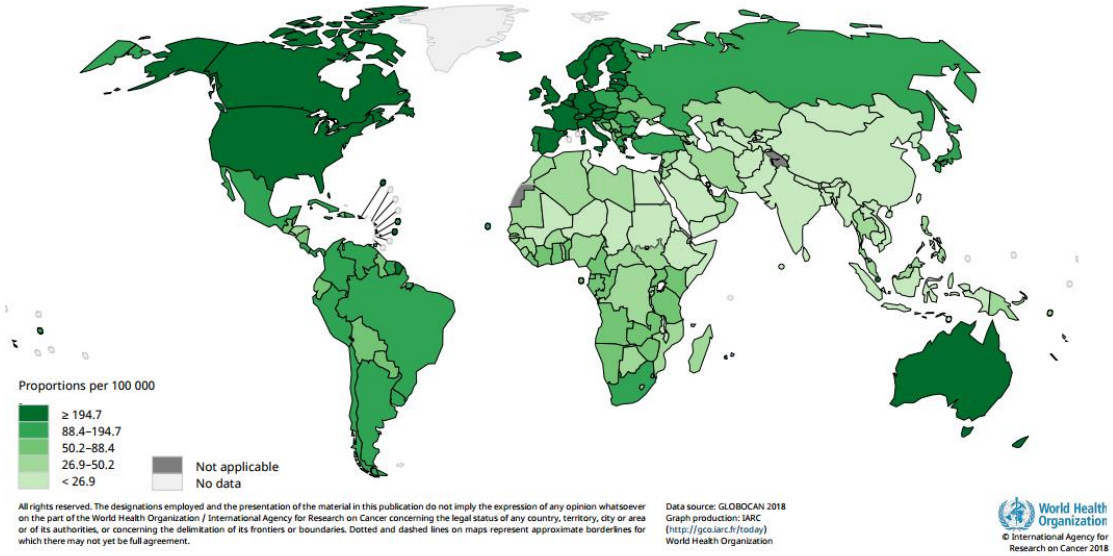

Figura 8. Número estimado de casos prevalentes (a 5 años) como una proporción en 2018. Reprinted from © International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2018. Estimated number of prevalent cases (5-year) as a proportion in 2018, prostate, males, all ages. Retrieved January, 08, 2019 from http://gco.iarc.fr/today.

1.2.3. Factores de riesgo.

Aunque la etiología o causas específicas del cáncer de próstata todavía no se conocen, hay pruebas considerables de que tanto la genética como el medio ambiente desempeñan un papel en su origen y evolución. Se han identificado algunos factores de riesgo que podrían aumentar la probabilidad de padecer la enfermedad, aunque su presencia no implica necesariamente el desarrollo de la misma. De este modo, mientras un individuo con pocos factores de riesgo puede padecer cáncer de próstata, otro con muchos puede no llegar a padecerlo nunca. El envejecimiento, el grupo poblacional y una historia familiar positiva son los únicos factores de riesgo claramente establecidos para el cáncer de próstata hasta el momento. Existen otros factores de riesgo potenciales que no presentan una asociación clara con la enfermedad, tales como la dieta, la inflamación, los andrógenos, la actividad sexual, la obesidad o la exposición a carcinógenos y a xenobióticos. A continuación se hablará de los más relevantes (*American Cancer Society*; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.1. Factores demográficos.

1.2.3.1.1. *Edad.*

El riesgo de padecer un cáncer de próstata se incrementa dramáticamente a medida que lo hace la edad del individuo. Pocas veces (<0,1%) se diagnostica antes de los 50 años, sino que el 85% de los pacientes recibe el diagnóstico después de los 65 años. Aunque se han detectado lesiones precursoras hasta en el 30% de los hombres en la cuarta década, hasta en el 50% de la sexta década y en más del 75% de los mayores de 85 años, el PCa tiene un progreso lento, pudiendo pasar desapercibido sin síntomas durante años (Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008).

Desde el punto de vista molecular, durante el envejecimiento se produce un aumento del estrés oxidativo, generando como consecuencia la acumulación progresiva de aductos en el ADN (carcinógenos unidos al ADN) así como un incremento en la frecuencia de roturas genómicas. La mayoría de las células en individuos jóvenes están equipadas con los mecanismos de defensa antioxidantes adecuados, pero a medida que se produce el envejecimiento, el fallo en estos mecanismos lleva a la acumulación progresiva de daños en el ADN que conduce al cambio maligno (Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.1.2. *Grupo poblacional y variaciones geográficas*.

Existen diferencias en la probabilidad de desarrollar cáncer de próstata según el grupo poblacional, teniendo los Negroides un riesgo más elevado que los Caucasoides y éstos mayor que los Mongoloides. Las incidencias más altas de cáncer de próstata se encuentran entre los hombres afroamericanos y del Caribe con ascendencia africana. Además, los individuos de estos grupos poblacionales desarrollan cáncer a edades más tempranas, siendo más agresivo y con una tasa de mortalidad más elevada. Por el contrario, las poblaciones asiáticas presentan las tasas de incidencia más bajas. Se han propuesto muchas hipótesis biológicas, ambientales y sociales para explicar estas diferencias: predisposición genética, dietas hipergrasas, concentraciones más altas de testosterona en el suero, mayor índice de masa corporal o un menor acceso a la sanidad y a las técnicas de *screening* poblacional como el PSA. Se sabe, además, que polimorfismos en el gen de la vitamina D o en genes relacionados con el metabolismo de andrógenos podrían influir en el riesgo diferencial de PCa entre los distintos grupos poblacionales. En la actualidad no existe ningún factor clave que explique estas diferencias y lo más probable es que su origen sea multifactorial (*American Cancer Society*; Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al.*, 2008)

El medio ambiente, concretamente la occidentalización, desempeña un papel fundamental en la modulación del riesgo al cáncer de próstata en todo el mundo. Así, los individuos afroamericanos tienden a ingerir cantidades importantes de grasas en la dieta que podría contribuir a su mayor riesgo de PCa. Aunque pueden darse diferencias entre los países asiáticos más occidentalizados como Japón o Israel y los menos occidentalizados como la India, Tailandia, Pakistán o China, en general el consumo de grasa en la dieta de estas poblaciones es bajo. En este sentido, se ha visto que los individuos asiáticos residentes en los Estados Unidos tienen un riesgo mayor de desarrollar PCa y morir por esta causa que sus familiares de Asia. Sin embargo, el riesgo de los estadounidenses asiáticos es inferior que el de afroamericanos o Caucasoides, lo cual indica que la genética mantiene un papel en cuanto a la predisposición a este tipo de cáncer (*American Cancer Society*; Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al.*, 2008)

En cuanto a las variaciones geográficas, se ha visto que el PCa es más común en Norteamérica y en la región noroeste de Europa, Australia y en las islas del Caribe. Por el contrario, la incidencia es menor en Asia, África, Centroamérica y Sudamérica. Las diferencias en la tasa de incidencia se comentan con más detalle en el apartado de epidemiología (*American Cancer Society*; Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al.*, 2008).

1.2.3.2. Factores hormonales.

1.2.3.2.1. *Andrógenos.*

Puesto que los andrógenos influyen en el crecimiento de la glándula prostática, se han asociado niveles elevados de estas hormonas con un riesgo incrementado de padecer PCa. No obstante, se desconoce la duración y la magnitud de la exposición necesaria para crear el marco de la carcinogénesis. De acuerdo con esto, tanto la ausencia prolongada de exposición a los andrógenos como una falta de actividad enzimática por inhibición de la 5α-reductasa con fármacos como el finasteride parecen proteger contra el cáncer. Esto aparece demostrado por el desarrollo de próstatas atróficas en varones tras la castración quirúrgica (Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al*., 2008).

Las diferencias en la tasa de incidencia y mortalidad entre grupos poblacionales guardan un paralelismo con las concentraciones de testosterona y DHT. Así, la incidencia más elevada de PCa en la población afroamericana puede guardar relación con las concentraciones elevadas de andrógenos circulantes, como sugiere un estudio en el que los afroamericanos jóvenes tienen una concentración un 15% mayor de testosterona circulante total que los Caucasoides (Ross *et al*., 1986), y niveles más altos de metabolitos de los andrógenos (DHT) que los japoneses (Ross *et al*., 1992).

Dado que el PCa es un tumor andrógeno-dependiente, polimorfismos en genes involucrados en su síntesis y metabolismo podrían estar asociados con la enfermedad. Se ha encontrado asociación entre un microsatélite (STR) presente en el receptor de andrógenos y el riesgo de PCa. Este polimorfismo implica la repetición en tándem del trinucleótido CAG en el exón 1 del gen *AR*, de modo que un menor número de repeticiones se asocia con una mayor incidencia y agresividad del tumor. Un elevado número de repeticiones del trinucleótido CAG se relacionan con la transactivación disminuida de la testosterona una vez que se une al AR, lo cual define un efecto protector contra el cáncer por la disminución de la proliferación epitelial en respuesta a los andrógenos. Se ha comprobado la existencia de diferencias poblacionales en las frecuencias de este microsatélite, de modo que los afroamericanos tienen una mayor prevalencia de repeticiones cortas del trinucleótido CAG, lo que resulta en un riesgo incrementado de PCa. Por el contrario los individuos asiáticos tienen un mayor número de repeticiones CAG, en concordancia con su menor incidencia (Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al*., 2008)

También se han descrito polimorfismos en el gen *SRD5A2*, que codifica para la enzima 5α-reductasa tipo II. Uno de ellos es el SNP A49T, en donde la sustitución aminoacídica de alanina por treonina en el codón 49 confiere una actividad enzimática cinco veces mayor y se ha asociado con mal pronóstico. Existen diferencias en la frecuencia de este polimorfismo entre distintos grupos poblacionales. La mayor tasa de sustitución aminoacídica en individuos de origen afroamericano desencadena una mayor actividad enzimática y concentraciones más elevadas de DHT, elevando la probabilidad de cáncer (Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.2.2. *Leptina.*

La leptina es una hormona peptídica, producida por los adipocitos, que contribuye al control del peso corporal mediante la modulación del uso de la energía y se encuentra en concentraciones más altas en las personas obesas. Se ha demostrado que la leptina estimula la proliferación de las líneas celulares de PCa independientes de andrógenos DU145 y PC-3. Además, la leptina parece inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento fibroblástico (FCF) así como estimular la migración celular. El desequilibrio energético mediado por la leptina está surgiendo como un posible factor contribuyente en la progresión a la metástasis y a la mortalidad en el cáncer de próstata (Wein *et al*., 2008).

1.2.3.2.3. *Otras hormonas.*

Factores hormonales como los estrógenos, la insulina o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) también se han vinculado con el desarrollo de carcinoma prostático, aunque los resultados acerca de su efecto protector o potenciador no son concluyentes (Wein *et al*., 2008; Ferrís i Tortajada *et al*., 2011; Botswick *et al*., 2004).

1.2.3.3. Inflamación crónica.

La inflamación crónica o prostatitis causada entre otros, por determinados agentes infecciosos de transmisión sexual, puede conducir al desarrollo de carcinoma prostático. Las evidencias histológicas de inflamación, como se manifiestan en la PIA, son frecuentes en el cáncer de próstata y pueden representar un proceso biopatológico clave en su desarrollo. La inflamación puede conducir a la tumorigénesis por medio de la estimulación de la angiogénesis, la hiperproliferación celular para reemplazar el tejido dañado o el daño al ADN por medio de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Se ha visto una reducción del riesgo a padecer adenocarcinoma de próstata asociado con productos antiinflamatorios, tales como la elevada ingesta de pescado graso y el consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como el ibuprofeno o la aspirina (Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.4. Estrés oxidativo.

El fallo en las defensas celulares contra el estrés oxidativo puede iniciar y perpetuar la carcinogénesis prostática. El estrés oxidativo es mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) que se unen al ADN, forman aductos y causan mutaciones. Otros modos de acción son las roturas de cadena sencilla y doble o la generación de sitios apurínicos y apirimidínicos. Aunque el estrés oxidativo se produce durante los procesos metabólicos normales y resulta fundamental durante el proceso inflamatorio para combatir microorganismos infecciosos, un exceso del mismo podría conducir a fenómenos tumorales. Los mecanismos de defensa celular contra este proceso comprenden enzimas antioxidantes que eliminan ROS y RNS e impiden las mutaciones, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la paraoxonasa

(PON1) o la glutatión S-transferasa (GSTP1). También son fundamentales en este proceso enzimas para reparar el ADN mutado y enzimas encargadas de la apoptosis en caso de que el daño al ADN sea demasiado grave para su reparación (Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.5. Índice de masa corporal (IMC).

El índice de masa corporal ha sido explorado en numerosos estudios epidemiológicos del PCa, encontrándose asociaciones positivas con la incidencia y la mortalidad de esta enfermedad. No obstante, no se sabe cuál de los dos factores que influencian el IMC es el más importante: el tejido adiposo o el muscular. Por una parte, la grasa blanca o tejido adiposo de los mamíferos no solo sirve de reservorio energético sino también como órgano endocrino secretor de hormonas como las citoquinas, las cuales podrían contribuir al desarrollo de un proceso inflamatorio. Además, varios estudios han demostrado que el IMC y la circunferencia de la cintura se correlacionan positivamente con el estrés oxidativo. Por otra parte, el volumen muscular en los brazos se ha vinculado con un incremento del riesgo de PCa debido a un aumento en las concentraciones de testosterona y DHT (*American Cancer Society*; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

Se ha sugerido que la obesidad podría constituir un factor importante en la etiología del carcinoma prostático, aunque los resultados no son concluyentes. La obesidad, definida como un IMC igual o superior a 30, particularmente la central o abdominal, se ha asociado con una menor probabilidad de desarrollar PCa de bajo grado pero con un incremento en la incidencia de formas más avanzadas o agresivas, mayor probabilidad de lesiones metastásicas y mortalidad más elevada. Entre los factores que podrían contribuir a este incremento en el riesgo de PCa para los individuos obesos se encuentran la dieta (alto consumo de carne y grasa), la tendencia a un menor ejercicio físico, los cambios en el equilibrio de las hormonas sexuales o un incremento en los niveles de insulina y leptina. De acuerdo con esto, se ha visto que reducciones de peso, gracias a un menor consumo de grasa en la dieta o a un aumento del ejercicio físico, reduce el estrés oxidativo, lo cual sugiere que la modificación del estilo de vida podría ser importante para disminuir el riesgo de la enfermedad. La peor prognosis asociada a individuos obesos podría ser el resultado de un retraso en el diagnóstico o de una respuesta terapéutica más baja (*American Cancer Society*; Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.6. Comportamiento y estilo de vida: factores ambientales.

1.2.3.6.1. *Dieta.*

Se ha sugerido que los factores dietéticos pueden contribuir al desarrollo de PCa. Una dieta occidental, alta en grasas, se ha asociado con un incremento en el riesgo de PCa, mientras que una dieta asiática vegetariana, baja en grasas y alta en fibra, se asocia con una disminución del riesgo (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

La *ingesta de grasa* es el factor de riesgo dietético más estudiado en la carcinogénesis prostática. El consumo de grasa, especialmente de ácidos grasos poliinsaturados, muestra una

correlación positiva con la incidencia y la mortalidad por PCa. Los mecanismos potenciales de acción son la inducción de estrés oxidativo y el cambio en el perfil hormonal, aumentando la concentración de andrógenos y estrógenos. Niveles elevados de grasas en la dieta estimulan la proliferación de células prostáticas, tanto *in vitro* como *in vivo,* y modelos animales revelan que una dieta sin grasas puede reducir el crecimiento de los tumores dependientes de andrógenos. El consumo de *carne*, sobre todo de carne roja y procesada, se ha asociado con un incremento en el riesgo de PCa, aunque se desconoce si tal efecto es debido a un alto contenido en grasa, mutágenos producidos durante el cocinado a alta temperatura como aminas heterocíclicas, proteínas animales u otros factores no identificados. Por otra parte, el consumo de *pescados* ricos en grasa se ha asociado inversamente con el riesgo de PCa, debido a que son ricos en ácidos grasos marinos como el omega-3, con potencial anti-tumorigénico (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

Se ha encontrado asociación entre el riesgo de PCa y *elementos traza* u *oligoelementos* como el *calcio*, el *zinc* o el *selenio*. El elevado consumo de *calcio,* a través de productos lácteos o suplementos nutricionales, se ha ligado a un incremento en el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer debido a la disminución de las concentraciones de vitamina D, con efectos anti-proliferativos. La reducción en el contenido de *zinc* puede ser un factor de riesgo para la carcinogénesis prostática. El zinc se encuentra en elevadas concentraciones en la próstata humana, probablemente ayudando a la formación del complejo andrógeno-AR y prolongando la viabilidad del esperma, y se ha visto que las concentraciones de este elemento se reducen con el envejecimiento y la carcinogénesis. Ensayos con el oligoelemento *selenio,* componente principal de muchas enzimas antioxidantes, sugieren que puede disminuir el riesgo de experimentar cáncer de próstata (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

Aunque el consumo de *frutas y vegetales* se ha asociado con la reducción del riesgo de varios tipos tumorales, su relación con el PCa es menos clara. La evidencia más fuerte se ha establecido con el consumo de *tomates* gracias al potente efecto antioxidante del licopeno, el cual inhibe el crecimiento de las células epiteliales prostáticas benignas y malignas *in vitro* (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008)

Con respecto del papel que ejercen las *vitaminas* en la carcinogénesis prostática, difiere en función del tipo vitamínico. Mientras que la vitamina A se asociado con un incremento en el riesgo de PCa, las vitamina C, D o E se han vinculado con un cierto efecto protector. La *vitamina E* o α-tocoferol, compuesto importante de aceites vegetales, cereales o frutos secos, actúa como principal antioxidante liposoluble de las membranas celulares. Esta vitamina puede influir en el desarrollo de cáncer por medio de la detención del ciclo celular o la inducción de la apoptosis, así como por una actividad anti-androgénica directa (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

Mención especial merece la vitamina D, cuyas fuentes en humanos son, tanto la dieta como, principalmente, la síntesis endógena catalizada por la exposición a la luz solar. Se ha visto que varios de sus metabolitos activos presentan acción hormonal, asociándose con una efecto anti-proliferativo sobre líneas celulares del PCa gracias a la inducción de la detención del ciclo celular. Por consiguiente, la deficiencia en vitamina D podría constituir un factor de riesgo para la carcinogénesis prostática. Estudios epidemiológicos han visto que la deficiencia en vitamina

D se puede deber a factores climáticos, poblacionales o dietéticos. Además, se han encontrado diversas variantes polimórficas en el gen del receptor de la vitamina D (*VDR*), asociados con una menor actividad y, consecuentemente, con un mayor riesgo de PCa (Wein *et al*., 2008).

Otros alimentos altamente consumidos en países asiáticos, como la soja o el té verde, se han vinculado con un cierto efecto preventivo frente al desarrollo de esta enfermedad (Botswick *et al*., 2004; Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.6.2. *Tabaquismo.*

El humo del cigarrillo puede ser un factor de riesgo para el cáncer de próstata porque es una fuente de exposición al cadmio, aumenta las concentraciones de andrógenos circulantes, produce estrés oxidativo celular y, principalmente, origina la formación de aductos en el ADN, lo cual aumenta la probabilidad de mutaciones. La formación de aductos en el ADN se debe a la presencia en el tabaco de carcinógenos como los hidrocarbonos aromáticos policíclicos (PAH) tipo benzopireno, las N-nitrosaminas, las aminas aromáticas, los aldehidos o algunos compuestos fenólicos. Por otra parte, el estrés oxidativo se produce debido a que el humo del cigarrillo contiene agentes oxidantes como óxido nítrico (NO) o radicales libres. Aunque los resultados procedentes de diferentes estudios son contradictorios y ninguno ha demostrado una relación dosis-respuesta clara, algunos han sugerido la asociación del tabaquismo con un estadio más avanzado del PCa en el momento del diagnóstico y una mortalidad más elevada (DeVita *et al*., 2008; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.6.3. *Exposiciones ocupacionales y ambientales.*

Los estudios de asociación entre diferentes exposiciones ocupacionales y el desarrollo de cáncer de próstata no son concluyentes. Se ha visto que los individuos con profesiones relacionadas con la industria pesada, la fabricación del caucho, la imprenta de periódicos o los bomberos, entre otros, podrían estar expuestos a sustancias químicas que incrementarían la probabilidad de desarrollar PCa. No obstante, la asociación más convincente deriva de los trabajadores de la agricultura, donde se ha encontrado un leve incremento en el riesgo de PCa. Esta asociación positiva ha sido vinculada a factores diversos: un elevado consumo de grasa en la dieta, principalmente carne roja derivada de animales de propia crianza, la mayor probabilidad de infección por virus zoonóticos y, sobre todo, una exposición elevada a sustancias químicas cancerígenas o xenobióticos como los fertilizantes, los pesticidas o los herbicidas (Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*, 2011).

Los xenobióticos son compuestos sintetizados por los seres humanos, que no se encuentran en la naturaleza, y que pueden llegar a acumularse en los tejidos de los seres vivos actuando como sustancias carcinogénicas. Se encuentran contaminando el medio ambiente, por lo que afectarán principalmente a los individuos más expuestos a ellos como trabajadores de distintas clases, pero también al resto de la población por medio del consumo de agua, los herbicidas, los pesticidas o el cadmio (Botswick *et al*., 2004; Ferrís-i-Tortajada *et al*, 2011).

1.2.3.6.4. *Actividad sexual y vasectomía.*

Los estudios que relacionan la actividad sexual y la carcinogénesis prostática no aportan conclusiones sólidas. Algunos autores han encontrado que un incremento en la frecuencia de la actividad sexual, así como el inicio a una edad temprana y tener un elevado número de parejas sexuales se podría asociar con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de próstata. Este fenómeno podría ser debido a un aumento de la actividad androgénica y, sobre todo, a una mayor exposición de la próstata a agentes infecciosos como VIH, sífilis, gonorrea o VPH, los cuales podrían ser responsables de un proceso inflamatorio crónico. Por otra parte, algunos estudios sugieren que la eyaculación frecuente podría reducir el riesgo de PCa, aunque la base biológica de este efecto sigue siendo desconocida (Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

Se ha sugerido que los hombres sometidos a una vasectomía podrían tener un riesgo incrementado de padecer PCa, aunque estos hallazgos necesitan ser confirmados. Esta modesta asociación positiva resultó ser mayor en individuos sometidos a una vasectomía a edades tempranas (Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.7. Quimioprevención.

Las estrategias de prevención pueden referirse a cambios modificables en el estilo de vida, tales como la dieta, el ejercicio físico o el tabaquismo, o a la quimioprevención, definida como el uso de agentes naturales o sintéticos que revierten, inhiben o previenen el desarrollo del cáncer. El objetivo de la quimioprevención es disminuir la incidencia de un cáncer, así como los efectos del tratamiento y la mortalidad. Esta técnica se basa en el uso de agentes no tóxicos que inhiben pasos moleculares específicos en la vía de la carcinogénesis. Entre los fármacos que en ensayos clínicos han demostrado mayor evidencia científica destacan los inhibidores de la enzima 5α-reductasa, convertidora de la testosterona en DHT, la finasterida o la dutasterida. La decisón de optar por este tipo de agentes se basó en la evidencia de que los andrógenos son necesarios para el desarrollo de PCa y que hombres con deficiencia congénita de 5α-reductasa tipo II no son afectados por esta enfermedad. También se han llevado a cabo estudios basados en la administración de suplementos con selenio, vitamina E o vitamina C, así como con fármacos inhibidores de la enzima COX-2 (Ferrís-i-Tortajada *et al*., 2011; Wein *et al*., 2008).

1.2.3.8. Factores genéticos.

Evidentemente, dado que la biología del organismo tiene el ADN como fuente primordial de toda expresión, el genoma y su variación es un factor clave a la hora de valorar el riesgo o protección al cáncer de próstata.

1.2.3.8.1. *Antecedentes familiares.*

En función de unos antecedentes familiares negativos o positivos, el cáncer de próstata puede ser clasificado en esporádico o familiar, respectivamente. Como subgrupo de la forma familiar se puede definir el hereditario: núcleos familiares con tres o más miembros afectados,

cáncer de próstata en tres generaciones sucesivas o dos individuos afectados con diagnóstico de cáncer antes de los 55 años. Estudios de segregación familiar han demostrado que el riesgo relativo aumenta según el número de miembros de la familia afectados por la enfermedad, su grado de parentesco y la edad en la cual fueron diagnosticados. De este modo, el riesgo de padecer PCa será más elevado para un individuo con un familiar de primer grado afectado (padre o hermano), sobre todo si el cáncer se presenta a una edad temprana (Tabla 2). Los cánceres de próstata familiar representan solo el 15% de los casos totales y, generalmente, son más agresivos que los esporádicos. La mayor agresividad se caracteriza por un rápido crecimiento tumoral, condicionando un grado histológico y un estadio en el momento del diagnóstico mayor, incrementándose tanto la probabilidad de metástasis como de mortalidad. Además, la forma familiar representa la mayoría de los casos de inicio temprano, pero solo una pequeña parte de los que se producen a edades avanzadas (Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008).

Tabla 2. Antecedentes familiares y riesgo de cáncer de próstata. Tomada de Wein *et al*., 2008

Antecedentes familiares	Riesgo relativo	Riesgo absoluto (%)
Ninguno	1	8
Padre o hermano	2	15
Padre o hermano afectado <60 años	3	20
Padre y hermano	4	30
Cáncer de próstata hereditario	5	35-45

1.2.3.8.2. *Variaciones del genoma humano.*

El genoma de los individuos es fuente de variabilidad, lo cual conduce a una funcionalidad diferente dependiendo de la variante alélica o genotípica que se presente. Como consecuencia de esta variabilidad, los individuos tendrán una mayor o menor predisposición genética al desarrollo de un carcinoma de próstata. Se han identificado algunos genes de susceptibilidad mayor al PCa (*HPC1*, *HPC2*, *MSR1*, *OGG1*, *CHEK2*, *BRCA2*, *PON1*, *MIC1*, entre otros), los cuales serían de alta penetrancia y determinarían la forma hereditaria del cáncer, sobre el 10% de los casos totales. No obstante, gran parte de la variación del genoma es un campo abierto que queda por explorar. Así, la mayor parte de la influencia genética en el cáncer de próstata vendría determinada por numerosas variantes genéticas de baja penetrancia, comunes en la población, y que pueden propiciar un riesgo diferencial a la enfermedad (Wein *et al*., 2008; Hsing & Chokkalingam, 2006).

1.3. APOPTOSIS.

El término *apoptosis* deriva del griego *apo* (de) y *ptosis* (caída), por su analogía con la caída de las hojas de un árbol en otoño o el desprendimiento de los pétalos de una flor. Fue acuñado en 1972 por el investigador Kerr y colaboradores para describir un tipo de muerte celular programada (PCD) genéticamente en el que se suceden una serie de cambios morfológicos típicos que lo diferencian de la necrosis o muerte celular accidental patológica causada por lesiones (De Vita *et al*., 2008).

1.3.1. Cambios morfológicos celulares.

La apoptosis es un proceso activo, controlado genéticamente, que ocurre tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, en el que se requiere energía en forma de ATP y síntesis proteica. La célula atraviesa una serie de cambios morfológicos característicos y altamente organizados. En una fase inicial, la célula, embebida en el tejido, experimenta un proceso de pérdida de agua y condensación de la cromatina. Esto conduce a una disminución del volumen celular, a la pérdida de adhesiones intercelulares y a la formación de ampollas o repliegues en la membrana plasmática (*blebbing*). El ADN cromosómico es fragmentado en las zonas internucleosomales, lo que genera fragmentos múltiplos de 200 pb (longitud aproximada del ADN de cada nucleosoma), dando como resultado un patrón de bandas en escalera cuando se visualiza en un gel de electroforesis (*DNA ladder*). A medida que avanza el proceso, la cromatina, altamente condensada, se dispone en la periferia del núcleo y éste termina por disgregarse en pequeños fragmentos (Fig. 9) (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; Luque & Herráez, 2001; Paniagua, 1997).

En una segunda fase, la célula se rompe para dar lugar a cuerpos apoptóticos, que consisten en material nuclear y citoplasmático englobado por fragmentos de membrana plasmática. En la fase final, estos cuerpos apoptóticos son fagocitados de forma específica. Se trata de un proceso limpio en el sentido de que las células que mueren por apoptosis no vierten su contenido al exterior, sino que mantienen intacta la estructura de la membrana plasmática y, además, son rápidamente retiradas de los tejidos gracias a la fagocitosis llevada a cabo por células vecinas o por células especializadas como los macrófagos. El proceso fagocítico se produce gracias al reconocimiento de la molécula fosfatidilserina en la superficie de la célula diana por parte de receptores expresados en fagocitos. En las células normales, la fosfatidilserina está restringida a la membrana interna, pero se expresa en la superficie celular durante la apoptosis. Este proceso de desintegración celular se lleva a cabo gracias a la escisión de una serie de sustratos por parte de las proteínas conocidas como caspasas ejecutoras, de las que se hablará en apartados posteriores (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; Luque & Herráez, 2001; Paniagua, 1997).

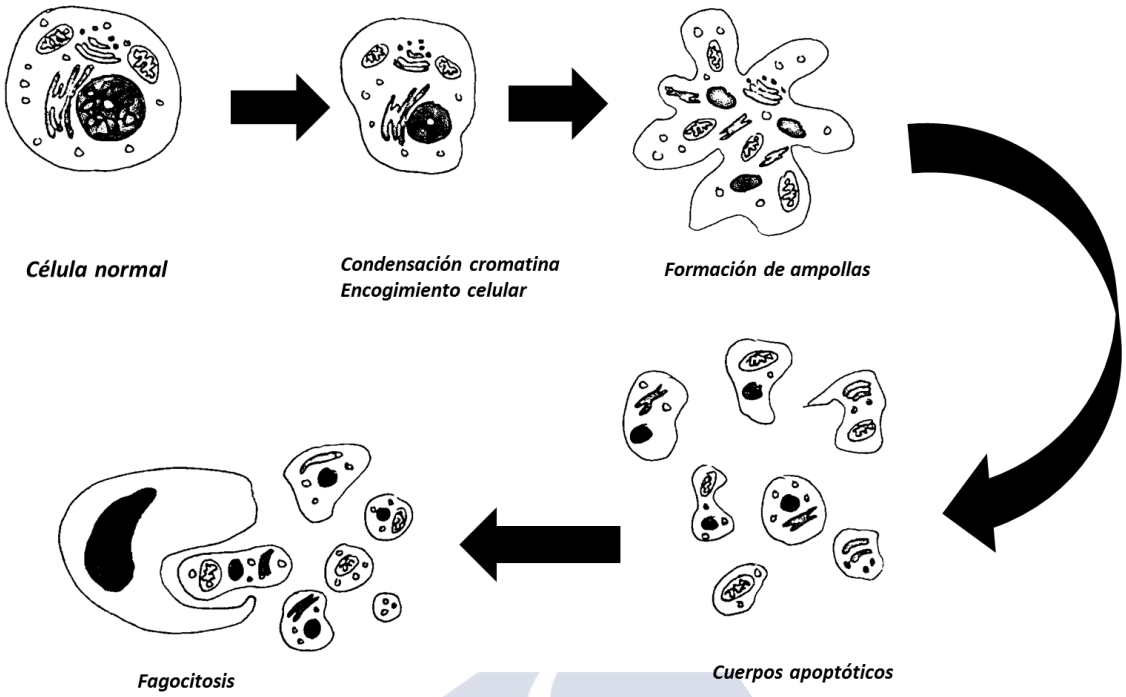

Figura 9. Cambios morfológicos que experimenta una célula en apoptosis.

1.3.2. Función de la apoptosis y trastornos asociados.

Generalmente, existen dos tipos de células que deben ser sometidas al proceso apoptótico: aquellas que se encuentran en exceso o bien las que representan un peligro para la integridad del organismo, lo que conlleva un papel fisiológico o patológico, respectivamente.

Desde un punto de vista *fisiológico*, la muerte celular programada resulta fundamental para la homeostasis tisular en los organismos multicelulares, tanto en la etapa embrionaria como en los individuos adultos. La muerte y la proliferación celular están equilibradas durante la vida de los organismos multicelulares. El desarrollo animal comienza con la rápida proliferación de las células embrionarias, que a continuación se diferencian para producir los diversos tipos de células especializadas que componen los tejidos y órganos adultos. Este complejo proceso de desarrollo implica, no sólo la proliferación y la diferenciación celular, sino también la muerte celular programada (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; García-Foncillas, 2003; Karp, 2006; Paniagua, 1997).

A nivel embrionario, la apoptosis resulta fundamental en la eliminación de células no deseadas de una variedad de tejidos. Este proceso, por ejemplo, es responsable de la eliminación de los tejidos larvales durante la metamorfosis de anfibios e insectos, como la reabsorción de la cola de los renacuajos. Otro ejemplo es la eliminación de un número fijo de células para llegar al estado adulto en el nematodo Caenorhabditis *elegans*. En mamíferos, la apoptosis resulta fundamental en la eliminación de las membranas interdigitales durante el proceso de formación de los dedos, en la muerte de las células del conducto de *Müller* para la diferenciación de los órganos genitales masculinos, en la destrucción de linfocitos T que reaccionan contra las

células normales del organismo para evitar síndromes autoinmunes o en el desarrollo del sistema nervioso (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; Karp, 2006; García-Foncillas, 2003; Paniagua, 1997).

En adultos, la muerte celular programada es responsable del equilibrio entre proliferación celular y mantenimiento del número celular constante en los tejidos que sufren renovación tisular. Por ejemplo, unas $5x10^{11}$ células sanguíneas son eliminadas diariamente en el hombre mediante apoptosis, equilibrando su continua producción en la médula ósea. La apoptosis en mujeres adultas también es responsable de la eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación, la regresión de las glándulas mamarias después de la lactancia o la atresia del folículo ovárico. En hombres participa en la atrofia de la próstata tras la castración (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; García-Foncillas, 2003; Karp, 2006; Paniagua, 1997).

Por otra parte, desde un punto de vista *patológico*, la muerte celular programada proporciona un mecanismo de defensa contra aquellas células que son potencialmente peligrosas para el organismo, como células con infecciones virales o con el ADN dañado. Las células infectadas por virus con frecuencia sufren apoptosis, previniendo así, la producción de nuevas partículas virales y limitando la propagación del virus a través del organismo hospedador. En el caso de células con el ADN dañado, la muerte celular programada puede eliminar células con mutaciones potencialmente dañinas que pueden dar lugar al desarrollo de un cáncer. Las células con daños irreparables en el ADN generalmente aumentan la expresión del gen supresor de tumores *p53* (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; García-Foncillas, 2003; Karp, 2006; Paniagua, 1997).

Las anomalías en la muerte celular programada se han asociado con una amplia variedad de enfermedades, tanto por su exceso como por su defecto. Un exceso de apoptosis puede conducir a enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer, el párkinson o la enfermedad de *Hungtinton*, debido a la eliminación de neuronas esenciales para la memoria o la coordinación motora. Por el contrario, la ausencia de apoptosis puede desembocar en trastornos autoinmunes si los linfocitos T autorreactivos no son eliminados, o bien a fenómenos carcinogénicos si las células con un daño irreparable en el ADN no son eliminadas y continúan su proliferación tumoral (Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; García-Foncillas, 2003; Karp, 2006; Paniagua, 1997).

1.3.3. Relación con el cáncer.

La noción de que el desarrollo y la progresión tumoral podrían estar influenciados por la apoptosis se remonta al artículo original de Kerr y colaboradores (1972), en el cual se plasmó la observación de que la tasa de crecimiento tumoral era menor que la predicha como resultado de un proceso de pérdida de células tumorales. Aunque inicialmente se asoció esta muerte celular con un proceso necrótico, estos investigadores pusieron de manifiesto que gran parte de la pérdida celular era debida a la apoptosis. Estudios posteriores revelaron que la muerte celular programada estaba detrás de gran parte de la regresión espontánea de tumores y del tratamiento tumoral con agentes anti-cancerígenos citotóxicos (Cotter, 2009; Lowe & Lin, 2000).

La homeostasis celular normal se mantiene debido a un constante proceso de crecimiento y muerte celular, de modo que el desequilibrio entre ellos puede dirigir a una proliferación celular incontrolada y al desarrollo de cáncer. Cuando una célula sufre una serie de daños irreparables en el ADN debe eliminarse por medio de apoptosis para evitar la acumulación de mutaciones que podrían desembocar en el proceso carcinogénico. La desregulación de la apoptosis, es decir, el desarrollo del fenotipo anti-apoptótico, es una de las seis características clave que se necesitan para que una célula se convierte en cancerosa, de modo que las mutaciones en los genes involucrados en esta vía se han asociado con distintos procesos carcinogénicos, incluyendo la iniciación, la progresión y la metástasis, al mismo tiempo que desempeña un papel importante en la resistencia a la terapia anti-tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011; Portt, Norman, Clapp, Greenwood & Greenwood, 2011).

De acuerdo con estos hallazgos, se ha asumido que los genes anti-apoptóticos podrían considerarase como oncogénicos y aquellos pro-apoptóticos como supresores tumorales y que podrían actuar de forma sinérgica para favorecer el desarrollo del cáncer (Jin & El-Deiry, 2005; Lowe & Lin, 2000; Portt *et al*., 2011; Wong, 2011; Zhivotovsky & Orrenius, 2006).

La mayoría de los fármacos anti-tumorales citotóxicos inducen la apoptosis, de modo que defectos en el programa apoptótico podrían contribuir a una resistencia a la terapia. Dado que las mutaciones que suprimen la muerte celular programada durante el desarrollo tumoral son las mismas que reducen la sensibilidad al tratamiento, la apoptosis proporciona un marco conceptual para ligar la genética del cáncer con la terapia tumoral (Lowe & Lin, 2000; Port *et al*., 2011).

La capacidad apoptótica es objeto de variaciones interindividuales, lo cual se ha atribuido a caracteres hereditarios como polimorfismos en genes involucrados en este proceso, que podrían conferir un riesgo diferencial a desarrollar cáncer. Se han llevado a cabo varios estudios con gemelos monocigóticos y dicigóticos para evaluar la influencia de los factores genéticos en la respuesta apoptótica individual. Mientras que en uno de ellos (Camplejohn, Hodgson, Carter, Kato & Spector, 2006) se ha estimado que el 81% de la capacidad apoptótica individual es atribuida a la herencia, en otro (Finnon *et al*., 2008) el valor de heredabilidad desciende hasta el 59%. De este modo, aunque se ha visto que la constitución genética es la mayor responsable de las características individuales en la respuesta apoptótica, un gran número de otros factores no genéticos también pueden jugar un papel importante (Imyanitov, 2009).

La relación entre la capacidad apoptótica y la susceptibilidad tumoral se puede abordar a dos niveles. Por un lado, la hipótesis más popular, sugiere que una capacidad apoptótica subóptima permite la preservación de células somáticas portadoras de daños en el ADN, ocasionados por distintos factores como el tabaquismo o el envejecimiento. De este modo, los humanos con una respuesta apoptótica más baja tienen más probabilidades de acumular células con mutaciones que conducen al cáncer y, por tanto, tendrán un riesgo incrementado de manifestación tumoral. Junto con el daño al ADN, la inflamación, provocada por factores como la obesidad, también crearía un microambiente favorable para la iniciación y expansión tumoral debido a la liberación de factores que incrementan la proliferación celular y la angiogenésis (Imyanitov, 2009).

La hipótesis alternativa utiliza un argumento totalmente distinto. En lugar de centrar la atención en la supervivencia de la célula diana, potencialmente tumoral en este caso, considera la capacidad apoptótica de las células que participan en el sistema inmune. De acuerdo con esto, una baja apoptosis estaría asociada con un aumento de la supervivencia de las células del sistema inmune, disminuyendo la probabilidad de escape tumoral, por lo que implicaría un menor riesgo de cáncer (Imyanitov, 2009).

1.3.3.1. Relación con el PCa.

La incapacidad de las células epiteliales prostáticas para experimentar apoptosis es un factor crítico que contribuye tanto al inicio como a la progresión del cáncer de próstata. Tanto las células prostáticas normales como aquellas que constituyen un cáncer de próstata primario son andrógeno-dependientes, es decir, necesitan de andrógenos como la testosterona y la DHT para poder sobrevivir y proliferar. Los andrógenos son capaces de estimular la proliferación celular, al tiempo que inhiben la muerte celular programada. Cuando las células prostáticas son sometidas a un proceso de deprivación androgénica sufren muerte celular programada, de modo que la tasa de apoptosis es superior a la de proliferación, causando una involución de la próstata normal y una regresión tumoral. Por este motivo, la principal terapia contra el carcinoma prostático es la ablación androgénica, esto es, la castración química o física (Denmeade, Lin & Isaacs, 1996; Gurumurthy, Vasudevan & Rangnekar, 2001; Mayora & Arvelo, 2011).

Sin embargo, la historia natural del cáncer de próstata es la progresión desde una enfermedad localizada andrógeno-dependiente hasta una enfermedad avanzada, invasiva y metastásica que se caracteriza por una pérdida de la sensibilidad a los andrógenos. De este modo, en el carcinoma prostático existe una presencia heterogénea de células andrógeno-dependientes, que serán sensibles a la ablación androgénica y otras células andrógeno-independientes, que no responderán a este tipo de tratamiento y darán lugar a estados avanzados de la enfermedad. El desarrollo de un cáncer de próstata andrógeno-independiente es el resultado del desarrollo de fenotipos resistentes a la apoptosis, permitiendo la supervivencia de las células tumorales. La maquinaria apoptótica está intacta en la mayoría de las células prostáticas, pero la incapacidad de experimentar apoptosis se debe a una serie de alteraciones moleculares que resultan en un fallo a la hora de iniciar o ejecutar el programa apoptótico (Denmeade *et al*., 1996; Gurumurthy *et al*., 2001; Mayora & Arvelo, 2011).

La apoptosis es el proceso fundamental que permite eliminar las células cancerosas tanto por medio de la deprivación androgénica como por quimioterapia o radioterapia. El papel que desempeña la muerte celular programada en la iniciación y la progresión de la carcinogénesis prostática brindaría la oportunidad de utilizar reguladores de la apoptosis como posibles dianas terapéuticas para mejorar las estrategias en el tratamiento de esta enfermedad, algunas de las cuales ya se están empezando a utilizar (DiPaola, Patel & Rafi, 2001; Wein *et al*., 2008).

1.4. MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES.

Los marcadores genético-moleculares (MGMs) son regiones del genoma que presentan variabilidad, independientemente de su tamaño. Los marcadores genético-moleculares estudiados en este trabajo se refieren a SNPs, polimorfismos que afectan a un solo nucleótido del genoma y cuya posición se identifica por un *reference site* (rs). Son los marcadores más abundantes del genoma humano, estimándose en una cifra superior a 335 millones. Las distintas variantes alélicas de un SNP pueden afectar a la expresión del gen en el que se encuentran o a la funcionalidad del producto proteico, por lo que resultan útiles para valorar el riesgo diferencial que presentan los individuos a desarrollar una determinada enfermedad, aunque el efecto de cada uno de ellos suele ser débil. No obstante, su efecto suele acentuarse cuando se examinan en conjunto con otros situados en el mismo gen o en la misma ruta de señalización, por lo que en este caso se examina la influencia en la carcinogénesis prostática de una batería de SNPs implicados en la regulación de la apoptosis y, en menor medida, en la modulación del ciclo celular.

La selección de los marcadores genético-moleculares para la tesis doctoral se ha basado en las siguientes premisas:

1. Aquellos que son materia de controversia en otros estudios o poblaciones y, por consiguiente, necesitan confirmación: rs2279115 (*BCL2*), rs1052576 (*CASP9*), rs1045485 (*CASP8*), rs4647603 (*CASP3*), rs1800682 (*FAS*), rs9904341 (*BIRC5*), rs1042522 (*TP53*), rs2279744 (*MDM2*), rs2066827 (*CDKN1B*).

2. Los que son inéditos en cáncer de próstata o en población de ancestralidad Caucasoide: rs1049216 (*CASP3*), rs2705897 (*CASP3*), rs11196418 (*CASP7*), rs763110 (*FASLG*), rs8073069 (*BIRC5*), rs937283 (*MDM2*), rs2395655 (*CDKN1A*), rs34330 (*CDKN1B*).

3. Marcadores totalmente inéditos en cáncer: rs3740286 (*FAS*), rs10509561 (*FAS*).

Para la selección de los marcadores se ha tenido en cuenta su posición en el genoma, esto es, su localización en una región reguladora del gen como el promotor génico o la secuencia codificante. Igualmente, debemos considerar que el grado de polimorfismo del marcador influye en la incidencia del cáncer y la potencia estadística del estudio. Es por ello que todos los marcadores que se han incluido en la tesis doctoral presentan una frecuencia del alelo menor (MAF) superior al 10% en población europea.

1.4.1. Familia Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2 juega un papel clave en la vía intrínseca de la apoptosis regulando la liberación del citocromo *c* y otras proteínas mitocondriales desde el espacio inter-membrana al citosol (Vaux, Cory & Adams, 1998).

El genoma de los mamíferos codifica alrededor de unas 20 proteínas que comparten dominios de homología con la proteína Bcl-2 (BH) y que pueden clasificarse en tres grupos: subfamilia Bcl-2, subfamilia Bax y subfamilia "solo BH3". Los miembros de la subfamilia Bcl-2 presentan cuatro dominios BH y comprenden proteínas con actividad anti-apoptótica o pro-supervivencia, entre los que se encuentran el propio Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bcl2-$_{A1}$ o Mcl1. Por

su parte, los miembros de la subfamilia Bax (Bax, Bak, Bok) y los miembros de la subfamilia "solo BH3" (Bid, Bim, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) son proteínas con función pro-apoptótica, presentando 3 dominios BH (1-3) o solo el dominio BH3, respectivamente. La mayoría de los miembros de esta familia presentan dominios hidrofóbicos en el extremo carboxi-terminal que les permiten asociarse con la región citosólica de las membranas intracelulares (Alberts *et al*., 2016; Angosto, 2003; Cooper & Hausman, 2017; Cory & Adams, 2002; García-Foncillas, 2003).

1.4.1.1. Bcl-2.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

El Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) es el miembro fundador de la familia de proteínas Bcl-2 (Vaux *et al*., 1988). Esta proteína fue descubierta por primera vez en linfomas foliculares de células B, la mayoría de los cuales presentan una translocación recíproca entre el cromosoma 18 y el cromosoma 14, t(14:18). Esto permite el movimiento del gen *BCL2* desde su posición original (18q21) al *locus* de la cadena pesada de la inmunoglobina en el cromosoma 14, cerca de la región *enhancer*. Como consecuencia, se produce un incremento en la activación transcripcional del gen *BCL2* y la sobreproducción de la proteína en células B, dando lugar al linfoma. El descubrimiento del *BCL2* permitió demostrar que no todos los oncogenes son responsables de promover la proliferación celular, sino que algunos inician la carcinogénesis inhibiendo la apoptosis (Kirkin, Joos & Zörnig, 2004; Vaux *et al*., 1988).

Con un peso molecular de 26 kDa, la proteína Bcl-2 posee en su extremo carboxi-terminal un dominio transmembrana, por lo que se trata de una proteína integral asociada normalmente a la cara citoplasmática de tres membranas intracelulares: la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplasmático y la envoltura nuclear. La estructura tridimensional consiste en un paquete globular formado por 6 α-hélices anfipáticas que rodean 2 α-hélices hidrofóbicas centrales (α5-α6). Los residuos BH1, BH2 y BH3 forman un surco hidrófico en la superficie de la molécula, el dominio receptor o de dimerización, el cual se une al residuo BH3 de miembros pro-apoptóticos de la familia (dominio ligando), inhibiendo su actividad biológica (Fig. 10) (Cory & Adams, 2002; Cory, Huang & Adams, 2003; Petros, Olejniczak & Fesik, 2004).

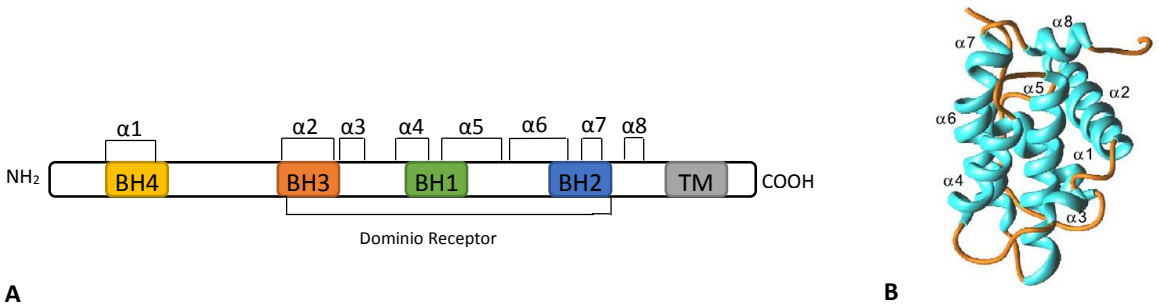

Figura 10. Estructura de la proteína Bcl-2. A. Representación esquemática. B. Representación tridimensional. Tomada de Petros *et al*., 2004 con permiso de Elsevier.

La principal función de la proteína Bcl-2 consiste en el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis, generalmente evitando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). Esta proteína puede llevar a cabo su función anti-apopótica de varias formas: inhibiendo el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), interaccionando directamente con miembros pro-apoptóticos de la familia Bax (Bax, Bak) o secuestrando proteínas pro-apoptóticas "solo BH3". De este modo, el destino final de una célula estará determinado por el balance entre miembros pro-apoptóticos o pro-supervivencia (Dai, Meng & Kaufmann, 2016; Harris & Thompson, 2000; Hata, Engelman & Faber, 2015; QIAGEN).

La presencia de un estímulo apoptótico (daño en el ADN, hipoxia, ausencia de factores de crecimiento…) conduce a la *upregulation* de las proteínas "solo BH3" y a la *downregulation* de las proteínas anti-apoptóticas. Esto permite la activación de los miembros pro-apoptóticos multidominio (Bax y Bak), que se ensamblan en complejos homodiméricos en la membrana mitocondrial externa, bien formando poros entre ellos o por medio de la interacción con el preformado poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC: VDAC, ANT, ciclofilina D). La formación de homodímeros se produce gracias a que uno de los miembros asume la conformación de receptor formando un surco hidrofóbico entre los dominios BH1-3 y el otro asume la conformación de ligando por medio del dominio BH3. La activación de Bax/Bak permite la permeabilizacion de la membrana mitocondrial externa, dirigiendo la salida del citocromo *c*. A continuación, el citocromo *c* se une con Apaf-1 y dATP para formar el apoptosoma, plataforma donde se activa la caspasa-9 (Cory *et al*., 2003; Dai *et al*., 2016; Hata *et al*., 2015; QIAGEN). Junto con el citocromo *c*, otras proteínas son liberadas del espacio intermembrana mitocondrial, tales como SMAC/DIABLO u Omi, las cuales son capaces de bloquear a las proteínas IAPs. La liberación de estos componentes favorece el proceso apoptótico, puesto que las IAPs funcionan inhibiendo las caspasas (Cooper & Hausman, 2017; Savitskaya & Onishchenko, 2015).

Se han propuesto distintos modelos de interacción entre los miembros de la familia Bcl-2 para la activación de Bak y Bax. Según el modelo directo (Fig. 11A), los miembros de la familia "solo BH3" pueden clasificarse en *activadores* o *sensibilizadores*. Los activadores (Bid, Bim, Puma) son aquellos capaces de activar directamente Bak y Bax, induciendo cambios conformacionales que permiten su homodimerización en la membrana mitocondrial externa. Los *activadores* se encuentran normalmente secuestrados por los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. De este modo, la función de los *sensibilizadores* (Bad, Noxa, Bmf, Bik, Hrk) es unirse a estas proteínas anti-apoptóticas, permitiendo la liberación de los *activadores*, los cuales pueden entonces unirse a Bax y Bak para llevar a cabo la apoptosis. Algunas proteínas "solo BH3" pueden presentar ambas funciones, como Bid (Cory *et al*., 2003; Dai *et al*., 2016; Hata *et al*., 2015; QIAGEN).

En el modelo de activación indirecto (Fig. 11B), Bak y Bax se encuentran constitutivamente activados y para evitar la MOMP espontánea se encuentran inhibidos por su unión a miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. En este modelo todas las moléculas "solo BH3" actúan neutralizando a las proteínas pro-supervivencia, lo cual libera a las moléculas de Bax y Bak previamente activadas. Por último, se ha propuesto un modelo unificador (Fig. 11C) de los dos anteriores, ampliamente apoyado por un elevado número de estudios. Según este sistema, los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 inhiben la MOMP secuestrando tanto a proteínas "solo BH3" *activadoras* como a moléculas de Bax y Bak activadas (Cory *et al*., 2003; Dai *et al*., 2016; Hata *et al*., 2015; QIAGEN).

Las proteínas "solo BH3" actúan siempre *upstream* de las pro-apoptóticas multidominio, pero cada una de ellas presenta especificidad de tejido y distintas afinidades de unión por los miembros anti-apoptóticos. Además, estas proteínas se activan en respuesta a distintas señales de estrés citotóxico y pueden ser activadas bien a nivel transcripcional o por medio de modificaciones postraduccionales, por lo que cada una de ellas participará en una vía de señalización diferente. Así, por ejemplo, Bad es regulado por medio de fosforilación en respuesta a diversos factores de supervivencia, Bid se trasloca a la mitocondria tras la escisión mediada por la caspasa-8 en respuesta a la unión del ligando a su receptor de muerte, Noxa/Puma están bajo control transcripcional por el p53 tras un daño al ADN, Bim sufre distintas modificaciones que lo activan en respuesta a la privación de factores de crecimiento…(Cory *et al*., 2003; Dai *et al*., 2016; Danial & Korsmeyer, 2004; Hata *et al*., 2015; QIAGEN).

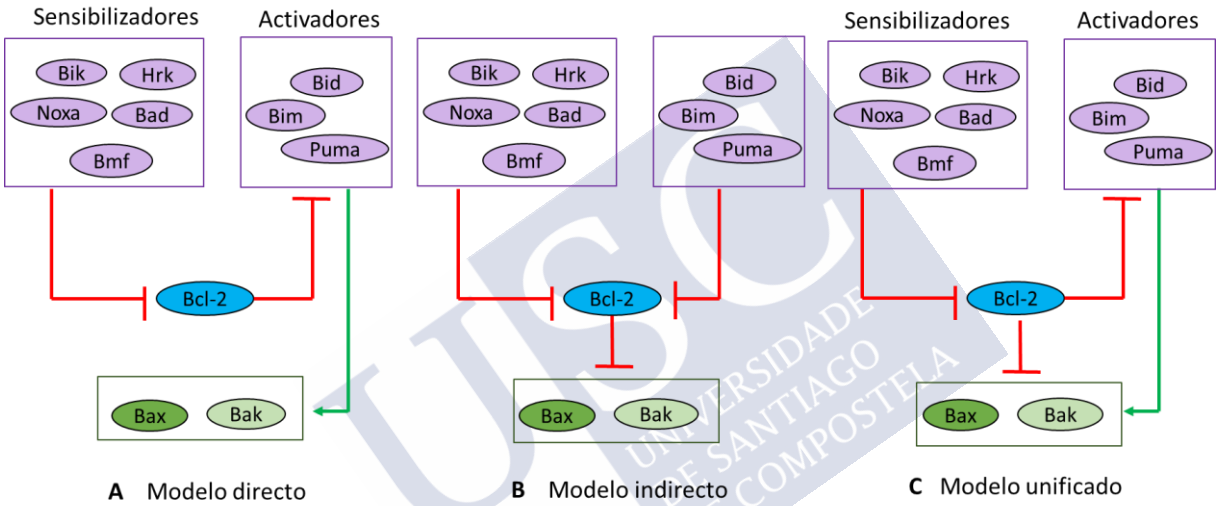

Figura 11. Función anti-apoptótica de la proteína Bcl-2 en la vía mitocondrial según distintos modelos de activación.

Por otra parte, se ha descrito que la proteína Bcl-2 puede promover la detención del ciclo celular en la fase $G_{0,}$ inhibiendo la proliferación. Aunque el mecanismo exacto por el que la proteína Bcl-2 produce un retraso en la entrada del ciclo celular se desconoce, algunos estudios apuntan a un incremento en los niveles de las proteínas inhibidoras p130 y p27. Parece que ambas funciones de la proteína Bcl-2 se encuentran genéticamente separadas, ya que la mutación en un residuo de tirosina antes del dominio BH4 (Tyr^{28}) mantiene intacta su función pro-supervivencia o anti-apoptótica pero elimina su capacidad de inhibir la entrada en el ciclo celular. La predominancia de una función biológica o de otra parece ser tejido-específica y contexto-dependiente (Cory *et al*., 2003; Kirkin *et al*., 2004; Zinkel, Gross & Yang, 2006).

- ***Contexto genómico.***

El gen *BCL2* está localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21.33), concretamente en la posición que se muestra en la Figura 12. Consta de un total de 3 exones y dos promotores (P1 y P2) con funcionalidades distintas. El promotor 1 dirige la activación

transcripcional del gen, mientras que el promotor 2, situado aguas arriba del primero, funciona como un regulador negativo de P1, disminuyendo su actividad y, por consiguiente, la expresión del gen *BCL2* (Bachmann *et al*., 2011; Nückel *et al*., 2007; Young & Korsmeyer, 1993).

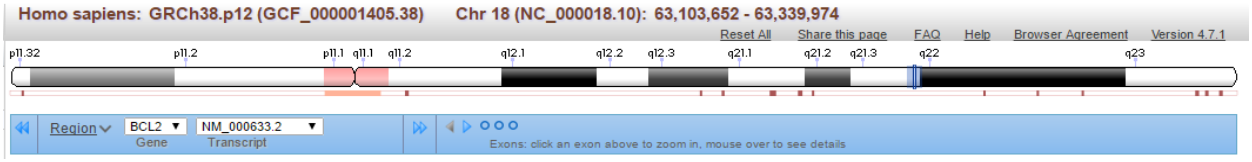

Figura 12. Localización cromosómica del gen *BCL2*. Tomada de Maglott, Ostell, Pruitt & Tatusova, 2011 (NCBI).

En este trabajo se ha estudiado el marcador rs2279115 (-938C>A) del gen *BCL2*, el cual supone un cambio de la variante C por A (REV) en la región promotora (5´UTR), concretamente en la posición -938 del promotor P2 (Park *et al*., 2004; Sherry *et al*., 2001). Esta región podría ser un sitio de unión a factores de transcripción, de modo que las diferentes variantes alélicas podrían presentar diferentes afinidades de unión, afectando a la actividad del promotor y a la expresión génica. Así, algunos autores encuentran que la variante C podría incrementar la actividad transcripcional del promotor 2 al ser un sitio de unión al factor Sp1. Esto aumentaría la regulación negativa sobre el promotor 1, disminuyendo la expresión del gen *BCL2* y aumentando la tasa de apoptosis (Bachmann *et al*., 2011; Nückel *et al*., 2007). No obstante, otros autores hallaron que el alelo C contiene secuencias de unión al factor de transcripción Sp1, pero el alelo A contiene secuencias de unión tanto para el factor Sp1 como para el Id2 (Eun *et al*., 2011), por lo que en este caso la regulación negativa sobre el promotor 1 podría ser mayor para los genotipos con el alelo A (Pan *et al*., 2015).

Además de estos hallazgos, se ha visto que el rs2279115 podría afectar a la expresión de distintas isoformas de la proteína Bcl-2, encontrándose una disminución de la expresión de la isoforma Bcl-2*β* en aquellos individuos portadores del alelo C. La Bcl-2*β* carece del dominio de unión a la membrana mitocondrial, por lo que carece de su actividad anti-apoptótica (Guillem *et al*., 2015). Por otra parte, el gen *BCL2* puede ser regulado a nivel transcripcional por el factor de transcripción p53, debido a elementos de respuesta a este factor en la región promotora. El p53 disminuye la expresión del gen *BCL2* por medio de la unión a la proteína Brn-3a, un factor de transcripción que se une también a la región promotora e incrementa la expresión del gen *BCL2*. El rs2279115 se encuentra situado en la zona de estos elementos de respuesta (Budharam-Mahadeo, 1999; Chen *et al*., 2007; Zhan *et al*., 1999), por lo que podría afectar a la regulación transcripcional por el p53. La variante alélica A se ha relacionado con una mejor interacción con el p53 (Chen *et al*., 2007), lo que disminuiría la expresión del *BCL2*.

A nivel global, el grado de polimorfismo del rs2279115 es bastante elevado, con una frecuencia del alelo menor A del 39%. Este alelo es el menos frecuente en poblaciones del Este de Asia (0,42), del Sur de Asia (0,31) o de África (0,17). No obstante, se corresponde con la variante alélica más frecuente en poblaciones europeas (0,57) (Fig. 13).

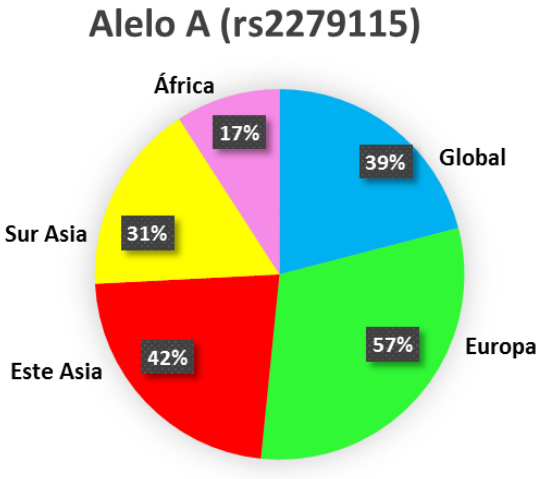

Figura 13. Variabilidad poblacional del rs2279115 (*BCL2*) según la frecuencia del alelo menor A. Basada en datos procedentes del 1000 *Genomes Project Consortium*.

- ***Relación con el cáncer.***

El descubrimiento de la proteína Bcl-2 en linfoma folicular de células B permitió cambiar el concepto previamente establecido de oncogén, el cual se aplicaba a genes que favorecían la carcinogénesis promoviendo la proliferación celular. El efecto pro-supervivencia de Bcl-2 permitió ver la relevancia de una apoptosis deficiente en la tumorigénesis. Los mecanismos que bloquean la apoptosis dirigen al desarrollo del cáncer porque permiten prolongar la vida media de las células y la adquisición de mutaciones potencialmente malignas, de modo que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 juega un papel fundamental en la carcinogénesis (Cory *et al*., 2003).

Además de los elevados niveles detectados en linfomas, esta proteína presenta sobreexpresión en una variedad de cánceres, incluyendo pulmón, melanoma, mama, próstata, colorectal, vejiga o leucemia mieloide aguda (Dai *et al*., 2016). El incremento en la expresión de Bcl-2 se ha visto, además, en adenomas colorrectales, neoplasia intraepitelial cervical y otras lesiones precancerosas, sugiriendo que juega un papel oncogénico durante los estadios tempranos de la carcinogénesis, además de ayudar al mantenimiento tumoral y la supervivencia (Dai *et al*., 2015; Kidd *et al*., 2006). Dicha sobreexpresión puede resultar de translocaciones cromosómicas, como se ha visto en el caso de linfoma de células B, pero también de amplificaciones génicas, de un incremento en la actividad transcripcional o de un procesamiento post-traduccional alterado (Hata *et al*., 2015). La pérdida de función de algunos supresores tumorales (p53, WT1, PTEN) o la ganancia de función de oncongenes (myc, ras) también puede favorecer el aumento en la expresión de Bcl-2 durante la tumorigénesis (Jagani, Kasinathan, Meka & Josyula, 2016; Kirkin *et al*., 2004).

Además de su función como proteína anti-apopótica y, por lo tanto, pro-tumorigénica u oncogénica, algunos estudios indican que puede comportarse como anti-tumorigénica o supresora tumoral debido a la detención del ciclo celular en la fase G_0, aunque se desconoce el mecanismo preciso. De este modo, el incremento en la expresión de Bcl-2 se ha asociado con resultados clínicos adversos en carcinoma de próstata, urinario, leucemia linfocítica crónica o linfoma de células B, mientras que se ha vinculado con un pronóstico favorable en cáncer de

mama, colorrectal, renal, pulmonar o de cabeza y cuello (Cory *et al*., 2003; Javid *et al*., 2015; Jiang, Zeng, Li & Tang, 2012; Kaur, 2014; Zinkel *et al*., 2006).

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 juega un papel fundamental en la patogénesis de cánceres epiteliales como el cáncer de próstata. La sobreexpresión del gen *BCL2* predispone al epitelio prostático a una inestabilidad genética, lo que puede conducir a la neoplasia y al fenotipo invasivo. Una alta expresión de Bcl-2, junto con una baja expresión de Bax, se ha asociado con el incremento de la transición desde un epitelio prostático normal a una neoplasia. En tejido prostático normal, la presencia de la proteína Bcl-2 solo ha sido detectada en células basales, no en células epiteliales secretoras. En hiperplasia prostática benigna tampoco se ha detectado expresión de Bcl-2, pero sí en la lesión precursora PIN. De este modo, se ha visto una sobreexpresión de esta proteína en células prostáticas humanas con lesiones precursoras de alto grado (HGPIN) con respecto de aquellas de bajo grado (LGPIN), lo cual sugiere un papel de esta proteína en el inicio del carcinoma prostático. El aumento en la expresión de Bcl-2 permitiría contratacar la apoptosis y proteger a las células con lesiones HGPIN de la muerte celular, favoreciendo la carcinogénesis (Catz & Johnson, 2003; Kidd *et al*., 2006).

El efecto que tiene la expresión de la proteína Bcl-2 en el pronóstico del cáncer de próstata presenta controversia. Aunque algunos autores no han encontrado asociación entre la expresión de este gen con la progresión del PCa, otros han descrito que una alta expresión se asocia con un índice *Gleason* y un estado patológico más elevados. Se ha visto, además, que esta proteína es necesaria para la transición desde un cáncer andrógeno-dependiente a otro andrógeno independiente. Una baja tasa de apoptosis debido a elevados niveles de Bcl-2 puede incrementar la probabilidad de mutaciones que favorecen la independencia androgénica. De acuerdo con esto, se han visto elevados niveles de esta proteína en células de PCa andrógeno-independientes y que su expresión aumentaba tras la ablación androgénica en aquellas andrógeno dependientes. Una elevada expresión de Bcl-2, junto con bajas de Bax, también se han correlacionado con el fenotipo metastásico, alta resistencia a la apoptosis y mala respuesta terapéutica (Catz & Johnson, 2003; Hirata *et al*., 2009).

El rs2279115 es uno de los polimorfismos del gen *BCL2* más estudiados en relación al inicio de distintos tipos de cáncer, entre los que se incluye la leucemia (Al-Kofee & Ismael, 2018; Cingeetham *et al*., 2015; Guillem *et al*., 2015), el linfoma de non-hodking (Wang *et al*., 2014), diversos cánceres de tipo oral (Chen *et al*., 2007; Fernández-Mateos *et al*., 2019; Liu *et al*., 2012; Pan *et al*., 2015; Eun *et al*., 2011; Wang, Zhao, Wang, Liu & Yu, 2012), el carcinoma de pulmón (Xu *et al*., 2013; Javid *et al*., 2015; Yang *et al*., 2016), el cáncer de vejiga (Kaur, 2014), el glioma (Li, Qian, Wang, Teng & Zhang, 2014; Qiu *et al*., 2019), el carcinoma mamario (Bhushann Meka *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2011), el cáncer cervical (Jiang *et al*., 2012), el cáncer gástrico (Mou *et al*., 2015) o el melanoma cutáneo (Oliveira *et al*., 2014).

El genotipo AA se ha vinculado con un aumento en el riesgo de padecer leucemia (Al-Kofee & Ismael, 2018), especialmente en individuos fumadores (Wang *et al*., 2014), carcinoma de esófago (Liu *et al*., 2012), glioma (Li *et al*., 2014), cáncer de mama (Bhushann Meka *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2011) o melanoma cutáneo en mujeres (Oliveira *et al*., 2014). En carcinoma oral (Fenández-Mateos *et al*., 2019) o melanoma cutáneo en hombres (Oliveira *et al*., 2014) la susceptibilidad se ha asociado tanto con el genotipo AA como con el AC.

Por el contrario, el alelo C, tanto en homocigosis como en heterocigosis, se ha asociado con una mayor predisposición a desarrollar leucemia mieloide crónica (Guillem *et al*., 2015), carcinoma de pulmón (Javid *et al*., 2015) o cáncer gástrico (Mou *et al*., 2015). Otros trabajos

vinculan exclusivamente a individuos portadores del genotipo CC con un aumento en el riesgo de carcinoma de pulmón (Yang *et al*., 2016), glioma (Qiu *et al*., 2019) o carcinoma de tiroides (Wang *et al*., 2012). Este genotipo se ha relacionado, además, con un mayor riesgo de cáncer de vejiga en los individuos fumadores (Kaur, 2014).

En cuanto a la expresión diferencial del gen *BCL2* en función del genotipo, tampoco se encuentra unanimidad. Así, mientras en población china se desvela una disminución en la expresión de *BCL2* para los genotipos AA y AC (Pan *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2011), en población india el genotipo AA se ha vinculado con un mayor índice proliferativo y una disminución en el nivel de apoptosis (Bhushann Meka *et al*., 2016).

Con lo que respecta al cáncer de próstata, se han publicado hasta el momento cuatro estudios valorando la interacción con el polimorfismo rs2279115. En el primero de ellos se analizan tres grupos poblacionales diferentes: afroamericanos, jamaicanos y estadounidenses de ancestralidad europea. Mientras que en las dos primeras poblaciones no se encuentra una relación significativa con la enfermedad, en el grupo de individuos Caucasoides se desvela un efecto protector de los genotipos AC y AA (Kidd *et al*., 2006). El segundo estudio se ha llevado a cabo en población japonesa (Hirata *et al*., 2009). Aunque en este trabajo no se desvela una asociación del SNP con el inicio tumoral, se encuentra que los individuos portadores del genotipo CC manifiestan un aumento en el riesgo de padecer recurrencia bioquímica tras una prostatectomía radical. El tercer trabajo publicado se refiere a población estadounidense y en él se encuentra que el genotipo CC se asocia con un aumento en el riesgo de PCa, niveles de PSA más elevados y una peor escala de *Gleason* en una cohorte de cáncer de próstata con un alto riesgo de enfermedad e historia familiar positiva (Hyndman, Xu, Zheng, Isaacs & Pavlovich, 2011). Por último, el trabajo de Meyer y colaboradores publicado en el año 2013, no desvela asociación del SNP con la carcinogénesis prostática en población alemana, ni a nivel global ni tras estratificar la muestra en función de la edad.

Aunque los estudios de asociación con el PCa muestran una tendencia de riesgo para el genotipo CC, en el trabajo de Bachmann y colaboradores (2011) han encontrado que líneas celulares de cáncer de próstata portadoras de la variante alélica C se asociaban con una mayor actividad transcripcional del promotor 2, una disminución en los niveles de ARNm de Bcl-2 y un pronóstico más favorable.

1.4.2. Familia caspasas.

Las caspasas (***c****ysteinyl* ***asp****artate-specific protein****ases***) son enzimas proteolíticas conocidas por su papel en la muerte celular programada y la inflamación (Shalini, Dorstyn, Dawar & Kumar, 2015). La función de las caspasas en la muerte celular fue identificada gracias a los estudios llevados a cabo en el nematodo Caenorhabditis *elegans*. En esta especie, 131 de las 1090 células somáticas que se forman durante el desarrollo de un adulto experimentan apoptosis. Las proteínas involucradas en este proceso presentan homología con las caspasas de mamíferos (Ellis & Horvitz, 1986; Yuan, Shaham, Ledoux, Ellis & Horvitz, 1993).

Según su función principal, las caspasas se han agrupado en dos subfamilias: pro-apoptóticas y pro-inflamatorias (Fig. 14). Las caspasas pro-apoptóticas (-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) están implicadas principalmente en mediar la transducción de señales de muerte celular,

mientras que las pro-inflamatorias (-1, -4, -5, -12) regulan la maduración de citoquinas durante la inflamación.

A su vez, las caspasas pro-apoptóticas han sido clasificadas en función de la longitud de sus prodominios en iniciadoras (-2, -8, -9, -10) y ejecutoras (-3, -6, -7). Las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos con motivos de interacción proteína-proteína que median su dimerización o reclutamiento a complejos multiproteicos para facilitar su activación: las caspasas -8 y -10 contienen dominios DED (*death effector domains*) mientras que la -2 y -9 tienen dominios CARD (*caspase activation and recruitment domains*). Por su parte, las caspasas ejecutoras contienen prodominios cortos sin motivos de interacción, siendo procesadas y activadas por caspasas *upstream* (Li & Yuan, 2008; Shalini *et al*., 2015).

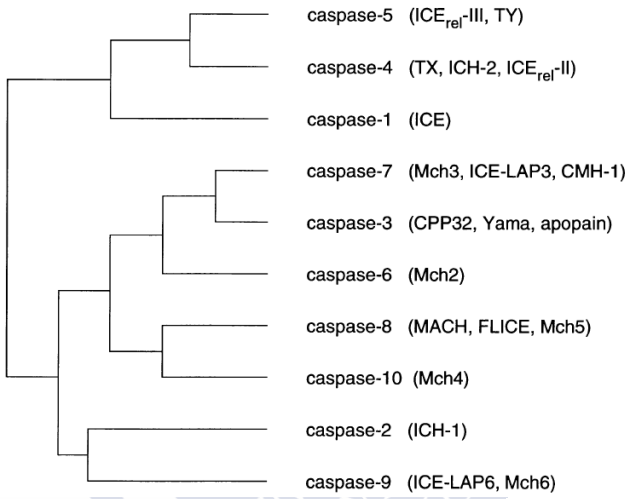

Figura 14. Relaciones filogenéticas entre los principales miembros de la familia de caspasas humanas y unificación de nomenclatura. Tomada de Alnemri *et al.*, 1996 con permiso de Elsevier.

Las caspasas son sintetizadas en la célula como un zimógeno inactivo conocido como procaspasa (Fig. 15A), la cual aparece formada por un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20/~20kDa) y una subunidad pequeña (p10/~10kDa). Para la activación del zimógeno es necesaria la escisión proteolítica entre la subunidad grande y pequeña, así como la eliminación del prodominio. En algunas caspasas existe un dominio de unión en los sitios de escisión, que se produce siempre después de un residuo de ácido aspártico (D). Los residuos catalíticos en la subunidad p20 consisten en el centro activo Cys^{285}, que forma parte de la secuencia pentapéptida conservada "QACXG", y el His^{237}. Este último residuo se encarga de estabilizar el grupo carbonilo del aspartato clave, mientras que el Cys^{285} escinde el enlace peptídico. El aminoácido X puede ser arginina (Arg, R), glutamina (Gln, Q) o ácido aspártico (Asp, D) (Fan, Han, Cong & Liang, 2005; Lavrik, Golks & Krammer, 2005; Li & Yuan, 2008; Stennicke & Salvesen, 1998).

Para referirse a la caspasa activa o madura se utiliza tanto la terminología de heterotetrámero como de homodímero. Esto se debe a que todas las caspasas necesitan la dimerización o unión de dos monómeros de procaspasa, pero no necesariamente la escisión proteolítica de las subunidades. Así, en las caspasas ejecutoras se hablará de heterotetrámero,

el cual estaría formado por dos subunidades grandes p20 y dos pequeñas p10. Alternativamente, en caspasas iniciadoras se podría hablar de homodímero formado por dos monómeros, en donde cada monómero estaría constituido por una subunidad grande p20 y otra pequeña p10 (Li & Yuan, 2008; Nicholson, 1999; Shi, 2002).

En la estructura tridimensional de la caspasa activa (Fig. 15C), las seis cadenas β-antiparalelas de cada monómero forman una hoja-β continua de 12 hebras, la hoja β-central, delimitada por varias α-hélices localizadas a cada lado. Los dos sitios activos, formados por cuatro bucles superficiales o "*activation loops*" (L1-L2-L3-L4), están ubicados en los dos extremos opuestos de la molécula (Li & Yuan, 2008; Nicholson, 1999; Shi, 2002).

Las caspasas escinden sustratos por medio del reconocimiento de, al menos, cuatro aminoácidos contiguos en ellos: P4-P3-P2-P1, presentando un requerimiento absoluto por el Asp (D) en posición P1. Los cuatro bucles del sitio activo son los que determinan esta especificidad de secuencia en los sustratos de las caspasas (Fig. 15D). Las caspasas -2, -3 y -7 prefieren la secuencia DEXD, mientras que las caspasas -6, -8, -9, -10 tienen preferencia por la (L/I/V) EXD (Chowdhury, Tharakan & Bhat, 2008; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004; Li & Yuan, 2008; Nicholson, 1999; Shi, 2002).

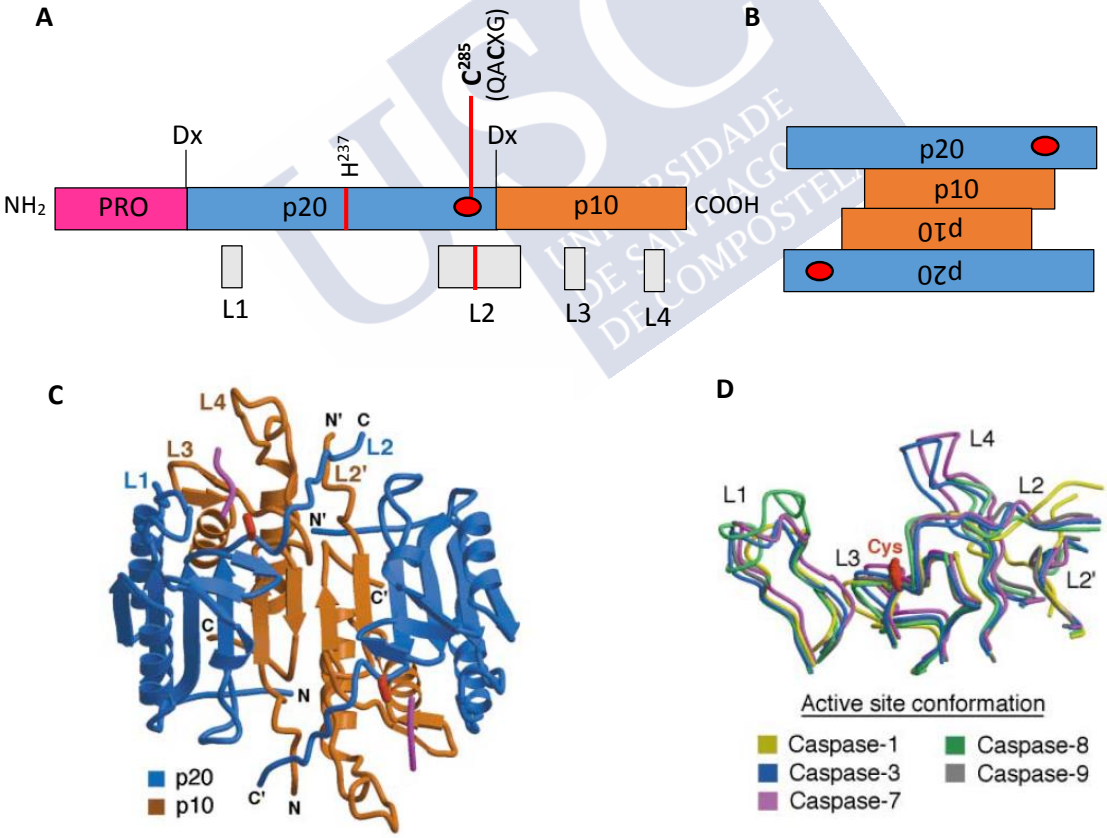

Figura 15. Estructura de las caspasas. A. Organización de la procaspasa en dominios y localización de los *loops* del sitio activo (L1-L4). Dx: residuo concreto de ácido aspártico en donde se produce la escisión dependiendo de la caspasa. El prodominio (PRO) puede contener dominios CARD o DED. Los residuos catalíticos se muestran en rojo. B. Organización de la caspasa activa en forma de heterotetrámero. C. Estructura cristalina o tridimensional de la caspasa activa. El inhibidor se muestra en morado. D. Conformaciones del sitio activo. Tomadas de Shi, 2002 con permiso de Elsevier.

La activación de las caspasas depende de su posición exacta en la cascada apoptótica. Puesto que son proteasas que escinden específicamente sustratos después de un resido de aspartato y que, además, su propia escisión se produce en un aminoácido de este tipo, permite que unas caspasas puedan ser secuencialmente activadas por otras o llevar a cabo su propia autocatálisis, estableciendo así una jerarquía de caspasas. De este modo, las caspasas ejecutoras, situadas *downstream*, son procesadas por otras caspasas apicales o *upstream*, las llamadas caspasas iniciadoras. Sin embargo, el procesamiento de las caspasas iniciadoras se produce por autocatálisis en sus respectivos complejos de reclutamiento y activación: el DISC (*death-inducing signaling complex*) en el caso de la caspasa-8 y la caspasa-10 o el apoptosoma en el caso de la caspasa-9. Este procedimiento se explicará más detalladamente cuando se describa cada caspasa en particular (Cohen, 1997; Stennicke & Salvesen, 1998).

1.4.2.1. Caspasa-9.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La caspasa-9 es la proteína encargada de desencadenar la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. En la Figura 16 se muestra la estructura de la procaspasa-9, con el motivo CARD en el prodominio, así como la caspasa-9 madura (Cohen, 1997; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004; Kuida, 2000; Li *et al.*, 2017; Li & Yuan, 2008; Renatus, Stennicke, Scott, Liddington & Salvesen, 2001).

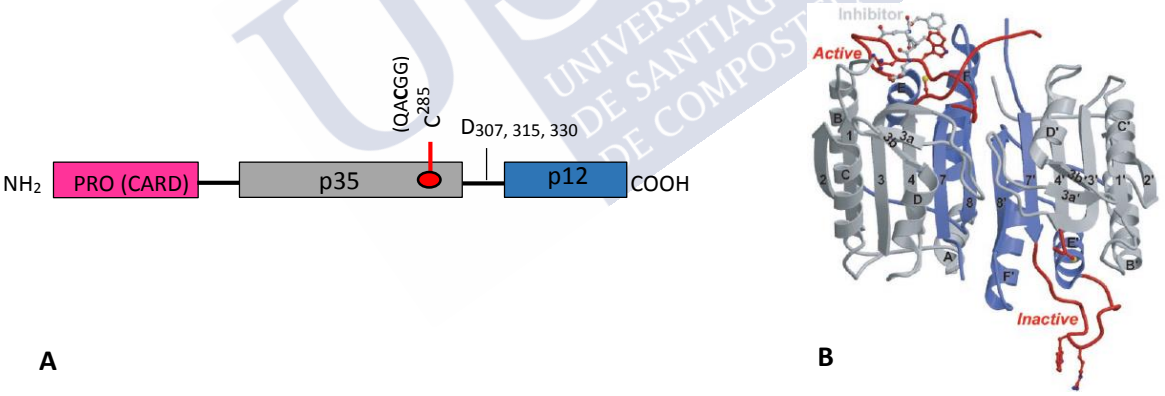

Figura 16. Estructura de la caspasa-9. A. Procaspasa-9. D_n es el residuo específico de ácido aspártico donde se produce la escisión de la proteína. B. Caspasa-9 madura. Se muestran las dos subunidades p35 (gris), las dos subunidades p12 (azul), los "*activation loop*" (rojo) y el péptido inhibidor (gris). Tomada de Renatus *et al.*, 2001. Copyright © 2001 National Academy of Science.

La función principal de la caspasa-9 es iniciar la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Fig. 18), desencadenada en respuesta a la necesidad de eliminación de células dañadas debido a distintos tipos de estrés intracelular: ausencia de factores de crecimiento, daño irreparable al ADN, drogas citotóxicas o estrés del retículo endoplasmático, entre otros. Cuando esto sucede, miembros de la familia pro-apoptótica de Bcl-2 (Bax, Bak) homo-oligomerizan para formar poros en la membrana mitocondrial externa. Esto permite la liberación del citocromo *c* del espacio inter-membrana al citosol, en donde se produce el ensamblaje del apoptosoma, un complejo proteico multimérico que involucra al citocromo *c*, la proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y el cofactor dATP/ATP (Fig. 17).

El motivo CARD de Apaf-1 es el responsable de la interacción con el prodominio CARD de la procaspasa-9, permitiendo su reclutamiento al apoptosoma y su activación. Por otra parte, los dominios WDRs del Apaf-1 permiten la interacción con el citocromo *c*, mientras que el NOD contiene un dominio ATPasa AAA+ (Fig. 17) (Bratton & Salvesen, 2010; Li & Yuan, 2008).

En ausencia de estímulo, el Apaf-1 existe como un monómero inactivo, unido a dATP, en una conformación bloqueada (Fig. 17A). No obstante, cuando se produce la unión del citocromo *c*, la hidrólisis de dATP dirige el cambio de Apaf-1 a una conformación semiabierta que tiende a formar agregados (Fig. 17B). Finalmente el intercambio nucleotídico de dADP por dATP permite la oligomerización del Apaf-1 (Fig. 17C), formando una plataforma de señalización con forma de rueda denominada apoptosoma (Fig. 17D). Este complejo contiene siete moléculas de Apaf-1, cada una de ellas unida a una molécula de citocromo *c*, y en él se producirá la activación de la caspasa-9. Una vez activada, la caspasa-9 es responsable de la escisión y activación de las caspasas ejecutoras -3 y -7, que serán responsables de escindir una serie de sustratos para llevar a cabo los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Bratton & Salvesen, 2010; Li & Yuan, 2008).

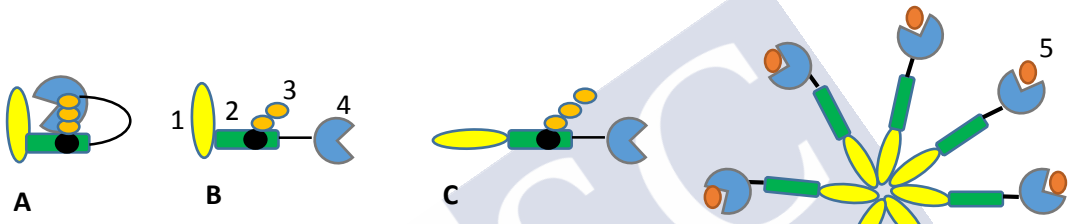

Figura 17. Representación esquemática del proceso de formación del apoptosoma. A. Conformación bloqueada. B. Conformación semi-abierta. C. Conformación activa. D. Apoptosoma. 1. Apaf-1 CARD. 2. NOD. 3. ATPasa. 4. WDRs. 5. Citocromo *c*.

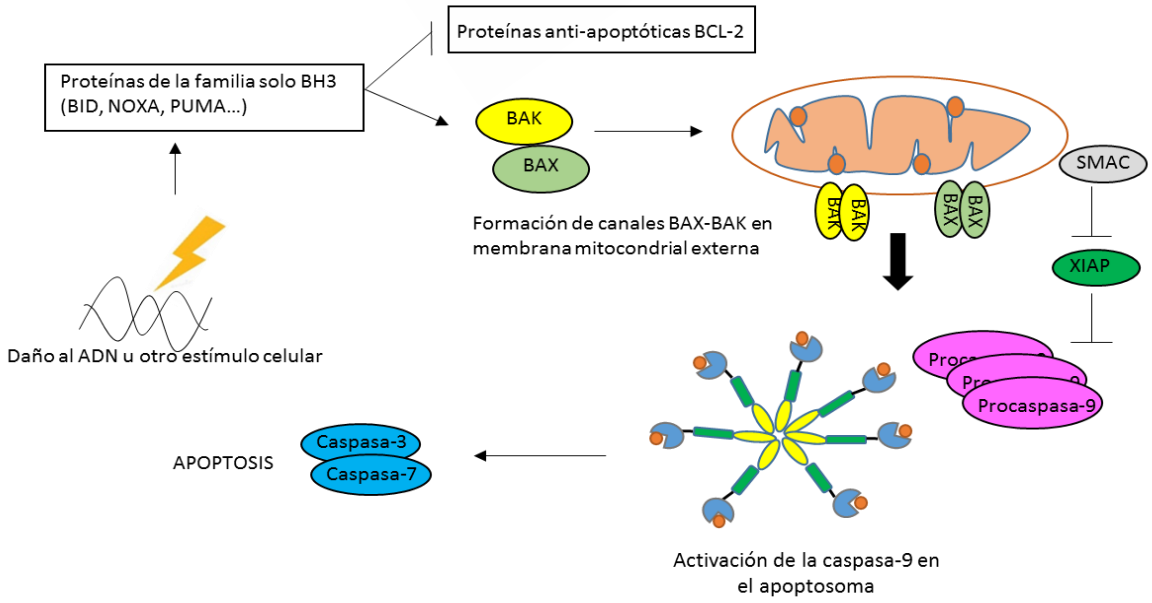

Figura 18. Regulación de la vía mitocondrial de la apoptosis mediante la caspasa-9.

Se han propuesto dos modelos que explican el proceso de activación de la caspasa-9 en el apoptosoma. Según el "modelo de proximidad inducido" las moléculas de procaspasa-9 se autoprocesan a sí mismas cuando una está en proximidad de otra. De esta forma, el apoptosoma proporcionaría simplemente una plataforma para la acumulación local de moléculas de procaspasa-9, permitiendo su homodimerización y activación. Por otra parte, el "modelo de conformación inducida" o de "holoenzima" defiende que el dominio CARD del Apaf-1 no solo ejerce influencia sobre el reclutamiento de las moléculas de procaspasa-9 al apoptosoma, sino que, además, provoca un cambio conformacional que permite su activación. De este modo, la caspasa-9 estará activa mientras permanezca unida al apoptosoma (Bratton & Salvesen, 2010; Li *et al*., 2017; Li & Yuan, 2008; Wu & Bratton, 2017; Würstle, Laussmann & Rehm, 2012).

La caspasa-9 puede ser regulada por un miembro de la familia IAP conocido como XIAP (*X-linked inhibidor apoptosis protein*), el cual a su vez puede ser inhibido por medio de las proteínas Smac/DIABLO que se liberan del espacio intermembrana (Fig. 18). La caspasa-3 puede activar la caspasa-9 gracias a la escisión de la proteína en el residuo D^{330}. Esto impide que la proteína XIAP actúe como un regulador negativo de la caspasa-9 (Bratton & Salvesen, 2010; Timmer & Salvesen, 2007).

- ***Contexto genómico.***

El gen *CASP9* está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.21) y cuenta con un total de 8 intrones y 9 exones. La localización exacta del gen se detalla en la Figura 19.

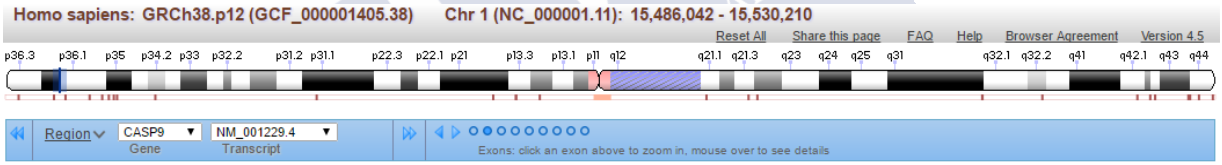

Figura 19. Localización cromosómica del gen *CASP9*. Tomada de Maglott *et al*., 2011 (NCBI).

En esta tesis se ha estudiado el rs1052576 (Ex5+32G>A) del gen *CASP9*. Este polimorfismo se encuentra situado en una región codificante del gen *CASP9*, concretamente en el exón 5, e implica el cambio de la variante G por A (REV). Se trata de una variante *missense* (Q221R), ya que la transición de A a G en el codón 221 de la proteína implica la sustitución del aminoácido glutamina (C**A**G, Q) por arginina (C**G**G, R) (Hirano *et al*., 2001; Sherry *et al*., 2001; *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Se ha propuesto que el cambio aminoacídico de glutamina por arginina podría conducir a cambios conformacionales en la proteína caspasa-9 modificando su afinidad por el factor Apaf-1 y disminuyendo, en consecuencia, la actividad del apoptosoma (Xu *et al*., 2012).

El rs1052576 se trata de un SNP, en general, bastante polimórfico, con una frecuencia del alelo menor (MAF) A igual a 0,42. No obstante, existe una gran variabilidad en la distribución de frecuencias alélicas en función del tipo de población estudiada (Fig. 20). De esta forma, la menor frecuencia del alelo A la encontramos en poblaciones africanas (0,26), seguida de poblaciones del Este Asiático (0,35). La frecuencia del alelo A en el Sur de Asia pasa a ser el mayoritario, llegando a alcanzar una frecuencia del 62% en algunas poblaciones. En Europa el grado de polimorfismo es muy elevado, con frecuencias poblacionales que oscilan entre 0,46 y 0,55 (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

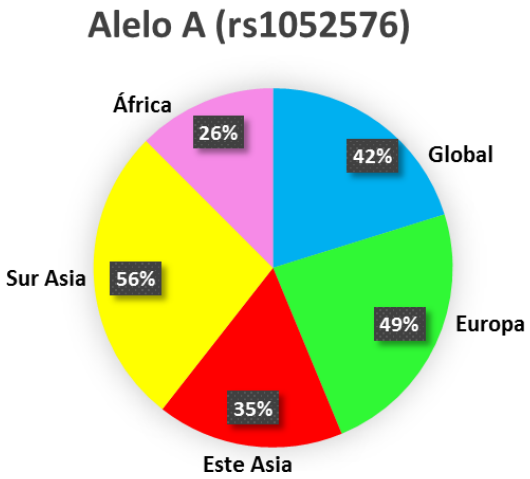

Figura 20. Variabilidad poblacional del rs1052576 (*CASP9*) según la frecuencia del alelo menor A. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

Se ha propuesto que la caspasa-9 podría funcionar como una proteína supresora tumoral (Olsson & Zhivotovsky, 2011). Dada su función crucial a la hora de convertir la señal de muerte celular en el inicio de una serie de eventos proteolíticos que terminan en la activación de las caspasas ejecutoras de la apoptosis, la caspasa-9 podría favorecer la eliminación de células potencialmente cancerígenas. Se ha visto que los timocitos aislados de ratones deficientes en caspasa-9 exhibían resistencia a varios estímulos pro-apoptóticos, incluyendo estrés genotóxico inducido por fármacos anti-cáncer (Kuida *et al*., 1998). Esta resistencia a la muerte celular programada sugiere que la inactivación de la caspasa-9 o la pérdida de su expresión son mecanismos que pueden estar implicados en el desarrollo del cáncer y la progresión tumoral. De este modo, la expresión reducida de la caspasa-9 se ha asociado tanto con el desarrollo como con la resistencia tumoral en carcinoma de ovario, melanoma, leucemia o cáncer de colon (Würstle *et al*., 2012).

Igualmente, se han identificado una serie de polimorfismos en la región promotora o codificante del gen *CASP9*, los cuales podrían afectar a su expresión o actividad y que estarían implicados en la predisposición a desarrollar distintos tipos de cáncer (Würstle *et al*., 2012).

Se han publicado una serie de estudios relacionando el polimorfismo rs1052576 con la susceptibilidad a desarrollar distintos tipos tumorales. No se ha encontrado asociación con el mesotelioma pleural maligno (Gemignani *et al*., 2009), el meningioma (Ozdogan *et al*., 2017) o el carcinoma de pulmón (Landi *et al*., 2006; Ulybina *et al*., 2009). En leucemia mieloide aguda la asociación con este polimorfismo no ha resultado significativa, pero se ha reportado un fuerte desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo rs4645982, moderado con respecto del rs4645978 y bajo con el rs4645981. De esta forma, en el análisis conjunto de los SNPs, se descubrieron dos haplotipos asociados con un aumento en el riesgo de padecer AML: G-del^{+}-G-A y G-del^{+}-A-A (Cingeetham *et al*., 2014).

Por otra parte, se ha descrito un descenso en el riesgo de padecer linfoma no Hodking (Lan *et al*., 2007), mieloma múltiple (Hosgood *et al*., 2008) y glioma (Ozdogan et al., 2017) para los individuos portadores del alelo A (AA+GA), especialmente para aquellos con el genotipo AA.

Los resultados de tres meta-análisis también desvelan un efecto protector frente al desarrollo del proceso carcinogénico asociado en general a los individuos portadores de la variante A (Xu *et al*., 2012; Yan *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2013).

Hasta el momento solamente se ha publicado un estudio relacionando el rs1052576 con la predisposición genética al cáncer de próstata. Se trata de un trabajo llevado a cabo en población turca con un total de 69 pacientes y 76 controles (Yilmaz *et al*., 2017). A tenor del bajo número de individuos contrastados, el estudio es meramente tentativo y ello nos permite entender que no ofrezca valores estadísticamente significativos. Esta realidad hace necesario un estudio más amplio acerca del comportamiento de este marcador en el cáncer de próstata, lo cual brinda una oportunidad para llevar a cabo su análisis en la población de Galicia.

1.4.2.2. Caspasa-8.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La caspasa-8 desempeña un papel fundamental en la apoptosis, ya que es la proteasa iniciadora de la vía extrínseca o mediada por receptor. En la Figura 21 se representa la estructura de la procaspasa-8, con dos dominios efectores de muerte (DED) en el prodominio, y la caspasa-8 madura (Fulda, 2009; Kruidering & Evan, 2000).

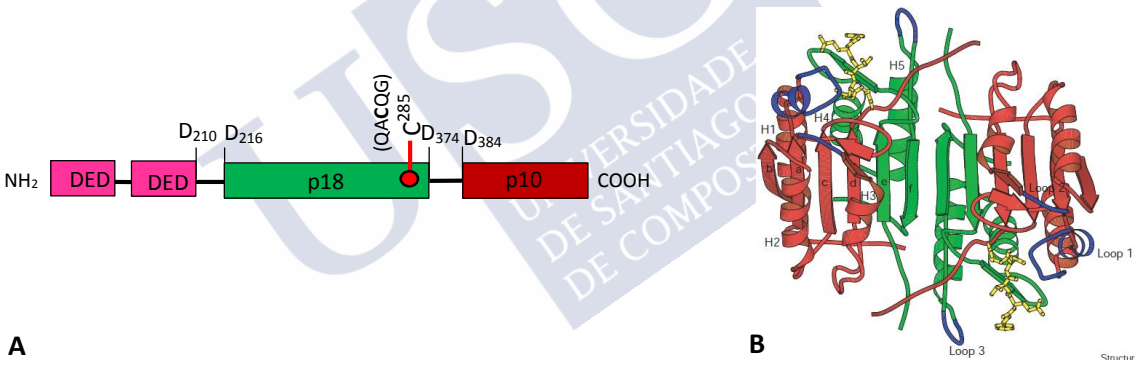

Figura 21. Estructura de la caspasa-8. A. Procaspasa-8. D_n es el residuo específico de ácido aspártico donde se produce la escisión de la proteína. B. Caspasa-8 madura. Se muestran las dos subunidades p18 (verde), las dos subunidades p10 (rojo), los *loops* del sitio activo (azul) y el péptido inhibidor (amarillo). Tomada de Blanchard *et al.*, 1999 con permiso de Elsevier.

La activación de la caspasa-8 se produce en la plataforma DISC, gracias al reclutamiento de la proteína a través de los dominios efectores de muerte. Tras la unión de un ligando de la familia TNF, los receptores apoptóticos de la familia TNFR se multimerizan en la membrana celular, de modo que el dominio de muerte (DD) de los mismos recluta la proteína FADD. La proteína FADD presenta un DD para interaccionar con el receptor, pero también un DED para reclutar moléculas de procaspasa-8. La proximidad entre monómeros de procaspasa-8 en esta plataforma permite su dimerización. Aunque el homodímero de caspasa-8 es activo en ausencia de escisión proteolítica, el autoprocesamiento estabiliza e incrementa la actividad de la proteína. La caspasa-8 activa puede liberarse del complejo y escindir sustratos como la caspasa-3, en células de tipo I, o la proteína Bid, en células de tipo II, para llevar a cabo la muerte celular programada (van Raam & Salvesen, 2012). Este complejo de señalización de muerte es idéntico

para los receptores de muerte FAS (ver introducción FAS-FASL), TRAILR1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*) y TRAILR2 (Fig. 22).

Por otra parte, el proceso de señalización del TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) aparece implicado tanto en rutas de muerte como de supervivencia celular (Fig. 23). En el complejo I se produce la activación de la vía NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), mediando la expresión de genes pro-inflamatorios y pro-supervivencia, entre los que se encuentra c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*). En el complejo IIa se activa la caspasa-8 conduciendo a la apoptosis, mientras que en el complejo IIb se activa la necroptosis, proceso que puede ser inhibido por la caspasa-8. Cuando la NF-kB es activada en el complejo I, el complejo II se asocia con el inhibidor FLIP y la célula sobrevive (QIAGEN, Salvesen & Walsh, 2014; Tummers & Green, 2017).

El proceso de activación de la caspasa-8 así como su función en rutas apoptóticas y no-apoptóticas aparece regulado por la interacción con proteínas c-FLIP, las cuales contienen dominios DED y son reclutadas por la proteína FADD a las plataformas de activación (Lavrik & Krammer, 2012). La caspasa-8 puede formar un heterodímero con la proteína c-FLIP$_L$, pero presenta un repertorio limitado de sustratos y no es capaz de escindir y activar sustratos pro-apoptóticos como la caspasa-3 o la proteína Bid. La activación a través de homodimerización da lugar a la capasa-8 procesada madura que induce la apoptosis, mientras que la heterodimerización con c-FLIP$_L$ parece desempeñar más funciones pro-supervivencia, como la inhibición de la necroptosis o la activación de la vía NF-kB (van Raam & Salvesen, 2012).

Además de su función en la apoptosis mediada por receptor, la caspasa-8 también parece estar regulada por el p53. Este supresor tumoral regula la expresión de la proteasa por medio de un elemento de respuesta al p53 situado en una región del gen *CASP8* adyacente al sitio de inicio de transcripción. Estas proteínas parecen actuar en un bucle de retroalimentación positiva, en el sentido de que los productos de la escisión de la caspasa-8, los dominios efectores de muerte, pueden activar al p53 para inducir la expresión génica de la caspasa-8, lo cual garantiza un continuo reemplazamiento de la proteína durante la apoptosis (Grochola, Zeron-Medina, Mériaux & Bond, 2010; Liedtke, Gröger, Manns & Trautwein, 2003; Yao, Duan, Hou, Heese & Wu, 2007).

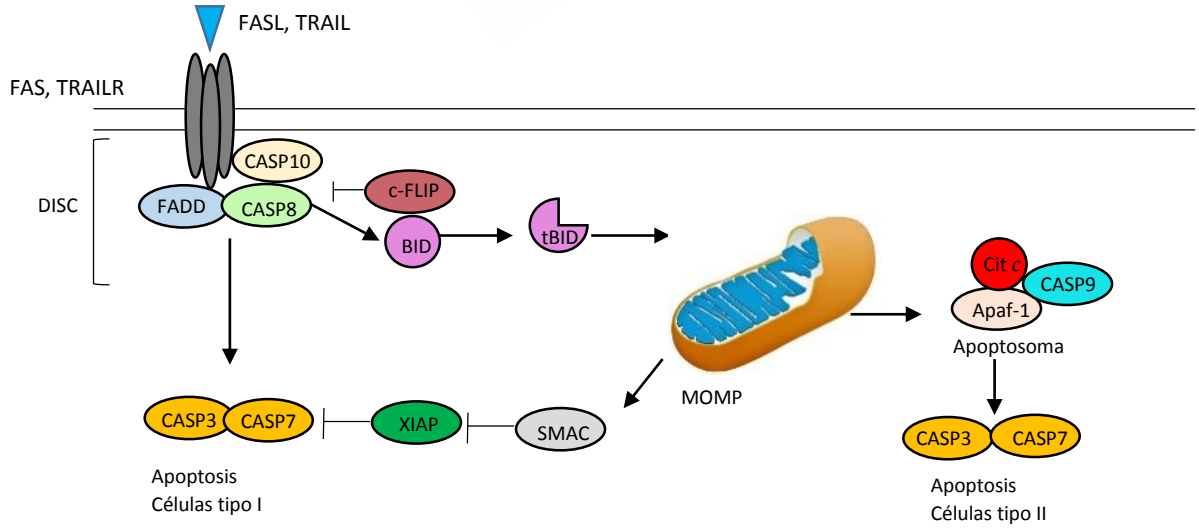

Figura 22. Regulación de la muerte celular mediada por los receptores FAS y TRAILR.

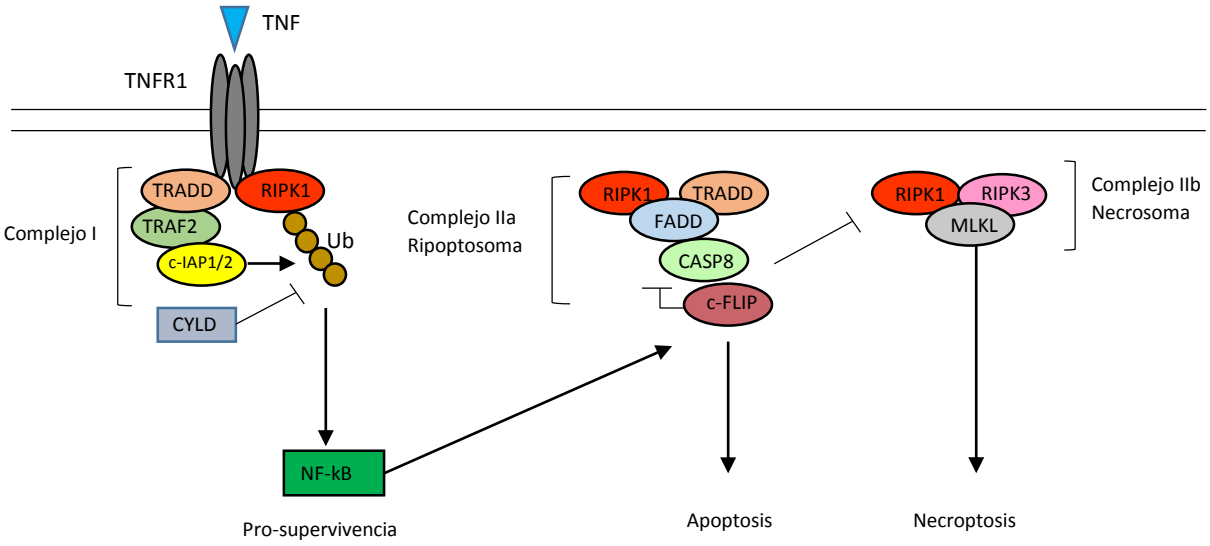

Figura 23. Regulación de la muerte celular mediada por el receptor TNFR1.

- ***Contexto genómico.***

El gen *CASP8* está localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q33.1) y contiene un total de 10 exones. Su posición exacta en el cromosoma se muestra en la Figura 24.

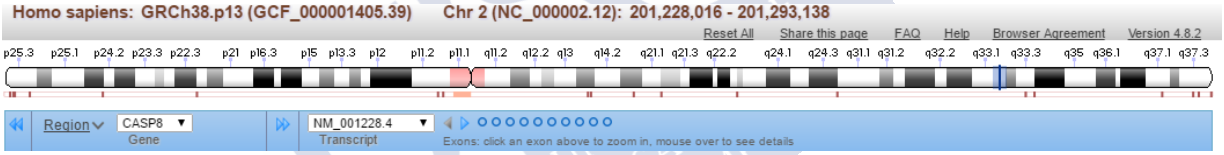

Figura 24. Localización cromosómica del gen *CASP8*. Tomada de Maglott *et al*., 2011 (NCBI).

En este trabajo se ha estudiado el marcador rs1045485, el cual se encuentra ubicado en el exón 9 del gen *CASP8* e involucra la permutación de la variante ancestral G por C (FWD). Se trata de una variante *missense* porque el cambio G>C acarrea la sustitución aminoacídica del ácido aspártico (D, **G**AT) por la histidina (H, **C**AT) en el residuo 302 de la proteína caspasa-8 (Sherry *et al*., 2001). Por este motivo, en la bibliografía se refieren a este SNP frecuentemente como D302H o Asp302His. Aunque el mecanismo molecular que determina una diferencia en la funcionalidad de las variantes está por dilucidar, se ha sugerido una influencia en el autoprocesamiento de las moléculas de procaspasa-8 o la interacción con reguladores anti-apoptóticos como c-FLIP, ya que el cambio aminoacídico podría afectar a la estructura de la proteína (Bethke *et al*., 2008).

El rs1045485 presenta un grado de polimorfismo muy bajo a nivel global, con una frecuencia del alelo menor (MAF) C del 5%. De hecho este SNP está ausente en todas las poblaciones del Este de Asia. En regiones del Sur Asiático la abundancia de este alelo es bastante homogénea, con una frecuencia media del 2%. Por el contrario, existe bastante diversidad en el continente africano, variando entre el 2% y el 8%. Europa es la región con un mayor grado de polimorfismo (12%), siendo una cifra bastante homogénea entre las distintas poblaciones (Fig. 25) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

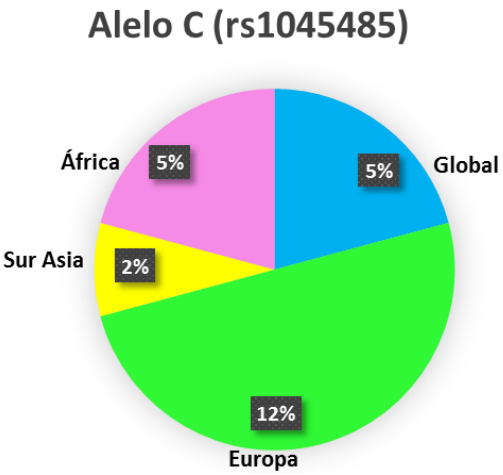

Figura 25. Variabilidad poblacional del rs1045485 (*CASP8*) según la frecuencia del alelo menor C. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

La inactivación de la caspasa-8 en el cáncer se produce por medio de mecanismos genéticos, tales como mutaciones y delecciones, o mecanismos epigenéticos, tales como la hipermetilación o la generación de isoformas de caspasa-8 por medio de *splicing* alternativo. Como ejemplo de ello se han descrito mutaciones en la caspasa-8 en cáncer colorrectal, gástrico o de cabeza y cuello, mientras que las delecciones son típicas del neuroblastoma. La hipermetilación de secuencias reguladoras de la caspasa-8 conduce a un silenciamiento de su expresión, y se han detectado en una variedad de tipos de cáncer. En lo que respecta al *splicing* alternativo, la isoforma caspasa-L, detectada en leucemia y neuroblastoma, presenta actividad anti-apoptótica y actúa previniendo el reclutamiento de la forma funcional a los receptores de muerte (Fulda *et al*., 2009).

Se ha visto que la caspasa-8 también puede participar en mecanismos celulares pro-supervivencia por medio de la activación de la vía NF-kB o la vía PI3K, así como en la adhesión y la migración celular. En este sentido, el aumento en la expresión de la caspasa-8 se ha asociado con el desarrollo de varios tipos de cáncer, especialmente el hepatocelular, el pancreático y el cervical (Fulda *et al*., 2009; Stupack, 2013).

Por lo tanto, dependiendo del contexto celular, la caspasa-8 puede tener un efecto potenciador o supresor tumoral. Esto determina distintos patrones de expresión en cánceres de origen epitelial en relación al tejido normal, encontrándose una disminución en hígado, próstata, pulmón o colorrectal y un aumento en glioma, cérvix, páncreas o hígado. El aumento de la expresión en estos tejidos tumorales se ha asociado con el desarrollo de funciones no apoptóticas de la caspasa-8, especialmente en células con deficiencias en la cascada de caspasas (Stupack, 2013).

Se ha valorado la relación del rs1045485 en el gen CASP8 con una variedad de tipos tumorales. No se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad a desarrollar neoplasmas mieloproliferativos (Azevedo *et al*., 2019); carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (Li *et al*., 2010), glioma (Rajaraman *et al*., 2007), carcinoma de vejiga

(Srivastava, Srivastava & Mittal, 2010), cáncer colorrectal (Pittman *et al*., 2008), carcinoma ovárico (Ramus *et al*., 2008) o cáncer de pulmón (Ulybina *et al*., 2009).

El alelo C se ha vinculado con una disminución en el riesgo a desarrollar cáncer de mama de una manera dosis-dependiente. De este modo, en referencia al genotipo GG se ha encontrado un efecto protector máximo para el genotipo CC y un menor efecto protector del genotipo CG. Estos resultados han sido corroborados en diversas poblaciones de ancestralidad europea (Cox *et al*., 2007; MacPherson *et al*., 2004; Shepard *et al*., 2009; Suela *et al*., 2010; Vahednia *et al*., 2019). No obstante, otros estudios en carcinoma de mama no han encontrado relación estadísticamente significativa con este polimorfismo (Barrdahl *et al*., 2014; Butt *et al*., 2012; Cardeñosa *et al*., 2012; Frank *et al*., 2005; Ottini *et al*., 2013; Park *et al*., 2016).

De acuerdo con los resultados obtenidos en cáncer de mama, en varias poblaciones de ancestralidad europea se ha descrito un efecto protector del alelo C frente al desarrollo carcinogénico, concretamente en cáncer pancreático (Couch *et al*., 2009), leucemia (Enjuanes *et al*., 2008) o melanoma (Li *et al*., 2008). Por el contrario, este alelo se ha asociado con un incremento de la susceptibilidad al carcinoma de esófago en población sudafricana de ancestralidad mixta (Bye *et al*., 2011) o al meningioma en población Caucasoide estadounidense (Rajaraman *et al*., 2007).

En cuanto al carcinoma de próstata, no se ha encontrado evidencia estadística de asociación con este polimorfismo en población alemana (Meyer *et al*., 2013), o del Norte de India (George *et al*., 2012). No obstante, se ha descrito un descenso en el riesgo de padecer la enfermedad de tipo agresivo asociado con el alelo C en población afroamericana y de ascendencia europea. En este estudio, el polimorfismo también manifiesta un efecto dosis-dependiente, presentando el genotipo CC el efecto más protector (Lubahn *et al*., 2010). Por lo tanto, los resultados encontrados en referencia a la influencia del rs1045485 en el desarrollo del cáncer de próstata no son concluyentes. Esta realidad, junto con el hecho de que solo ha sido analizado en una población europea y no se ha valorado su interacción con factores ambientales como el tabaquismo, convierte a este polimorfismo en un excelente candidato como objeto de estudio en población gallega.

1.4.2.3. Caspasa-3 y caspasa-7.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La caspasa-3 es la proteína ejecutora de la apoptosis y, como tal, se encarga de escindir los sustratos que permitirán llevar a cabo los cambios morfológicos celulares típicos de este proceso. La procaspasa-3 contiene un prodominio corto sin motivos de interacción entre proteínas (Fig. 26A) y la enzima activa es un heterotetrámero que se genera por la escisión de la proteína después de los residuos de ácido aspártico (Fig. 26B) (Cohen, 1997; Fernandes-Alnemri, Litwack & Alnemri, 1994; Kumar, 1997; Nicholson *et al*., 1995; Tewari *et al*., 1995; Woo *et al*., 1998). Aunque la caspasa-3 presenta una preferencia por los sustratos con la secuencia peptídica DEVD↓G, puede escindir todos aquellos con el motivo DXXD (Cohen, 1997).

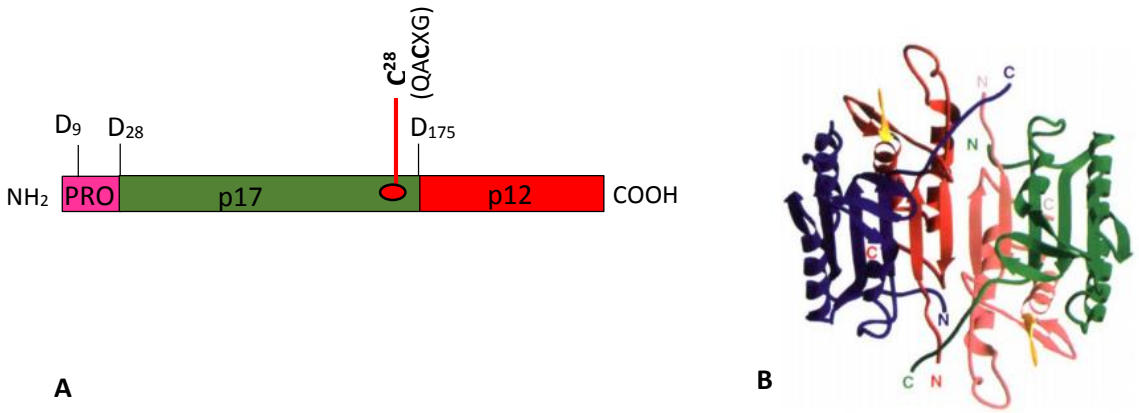

Figura 26. Estructura de la caspasa-3. A. Procaspasa-3. Dn: residuo específico de Asp en el que se produce la escisión de la proteína. B. Estructura tetramérica de la CASP3. Las subunidades p17 están coloreadas en verde y azul, mientras que las subunidades p12 en rosa y rojo. Las flechas amarillas indican el sitio de unión del péptido inhibidor. Tomada de Rotonda *et al.*, 1996 con permiso de Springer Nature.

La caspasa-3 es una proteasa efectora *downstream* en la cascada proteolítica, siendo clave en la ejecución final de los cambios morfológicos de la apoptosis. Esta proteasa puede ejercer múltiples efectos en la muerte celular programada, pero su actividad presenta especificidad, tanto a nivel celular y de tejido, como en función del estímulo recibido.

La caspasa-3 puede ser activada por dos vías proteolíticas diferentes: la vía intrínseca a través de la caspasa-9 y la vía extrínseca a través de las caspasas -10 y -8. Esta proteína puede ser activada, además, por las caspasas -1 y -2, así como por la proteína granzima B o la calpaína (Fan, Han, Cong & Liang, 2005). Hay un elevado número de familias proteicas que pueden inhibir la caspasa-3, proporcionando un mecanismo regulatorio contra la apoptosis indeseada de las células. Entre ellas se encuentran las proteínas *p35*, *CrmA*, y especialmente miembros de la familia IAP como la survivina y XIAP (Cohen, 1997; Timmer & Salvesen, 2007).

Durante la fase de ejecución de la apoptosis, la caspasa-3 es responsable de la escisión proteolítica de un amplio número de sustratos implicados en diferentes funciones celulares (Cohen, 1997). Aunque se piensa que la caspasa-3 tiene más de 42 sustratos, en este apartado se comentarán los más destacados (Fig. 27).

Una de las características más reseñables de la muerte celular programada es la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Para llevar a cabo este proceso, la caspasa-3 escinde una serie de sustratos, entre los que se encuentran la *protein kinasa C delta* (PKC-δ), el factor *acinus* y, especialmente, el factor ICAD/DFF-45 (*Inhibitor Caspasase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor)*. En condiciones normales, la endonucleasa CAD/DFF-40 se encuentra inhibida por la unión al factor ICAD/DFF-45. La escisión por parte de la caspasa-3 de dicho inhibidor libera la endonucleasa, siendo responsable de la condensación nuclear y la fragmentación del ADN internucleosomal, dando lugar al patrón en bandas característico de la muerte celular programada (Cohen, 1997; Porter & Jänicke, 1999; Robertson, Orrenius & Zhivotovsky, 2000).

Otro de los cambios morfológicos típicos de células que experimentan apoptosis es la reorganización del citoesqueleto para formar ampollas, más comunmente conocido como

membrane blebbing. La caspasa-3 es responsable de escindir sustratos implicados en este proceso, tales como la gelsolina, la fodrina, o el *ROCK-1* (*rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1).* La activación por escisión de estas proteínas permite cortar filamentos de actina y reordenar el citoesqueleto, favoreciendo que las células se redondeen y se despeguen de las circundantes (Luthi & Martin, 2007; Porter & Jänicke, 1999).

Otros sustratos escindidos por la caspasa-3 se refieren a enzimas encargadas de la reparación del ADN, como la PARP (*Poly-ADP-Ribose Polymerase*) o la DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*). La enzima PARP fue el primer sustrato conocido de la caspasa-3 y su principal función es detectar errores de cadena sencilla en el ADN y promover su reparación, con el consecuente gasto de ATP. La escisión de esta proteína por parte de la caspasa-3 impide su función como enzima reparadora del ADN e incrementa las reservas de ATP para llevar a cabo el proceso de apoptosis. Por su parte, la escisión de la subunidad catalítica de la DNA-PK (DNA-PKcs) disminuye la capacidad de reparación de errores de doble cadena (Cohen, 1997).

La ausencia de las proteínas PARP y DNA-PK mejora la eficacia de la endonucleasa a la hora de fragmentar el ADN internucleosomal durante el proceso de apoptosis, en tanto que evita reparaciones innecesarias del ADN que pudieran retrasar la degradación de la cromatina (Oliver, Menissier-de Murcia & de Murcia, 1999). Se ha visto, además, que la inhibición de enzimas implicadas en la reparación del ADN resulta en un incremento de los niveles del supresor tumoral p53 debido a la persistencia de daños genómicos no reparados, lo cual dirige la célula a la apoptosis (Lu & Lane, 1993; Oliver *et al*., 1999).

En relación con la función anterior, la caspasa-3 también es capaz de escindir proteínas involucradas en el *splicing* del pre-ARNm, como la partícula ribonuclear pequeña U1-70kDa o las ribonucleoproteínas heteronucleares hnRNP. La inhibición del *splicing* del ARNm podría bloquear las vías de reparación que dependen de la síntesis de *novo* de ARNm. Esta estrategia aseguraría que la energía de la célula apoptótica no se desperdice procesando moléculas de ARNm que ya no son necesarias para las funciones celulares (Cohen, 1997; Waterhouse *et al*., 1996).

Por otra parte, la caspasa-3 es capaz de escindir y activar dos factores de transcripción relacionados con el metabolismo del colesterol: *SREBP-1 y SREBP-2* (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*). Se piensa que esta activación de los SREBPs, y por consiguiente la activación de la síntesis del colesterol y el ingreso de LDL, es necesaria en el proceso de apoptosis para preservar la integridad de la membrana plasmática durante la apoptosis, o bien para marcar las células con el objetivo de una posterior degradación por los macrófagos (Wang *et al*., 1996).

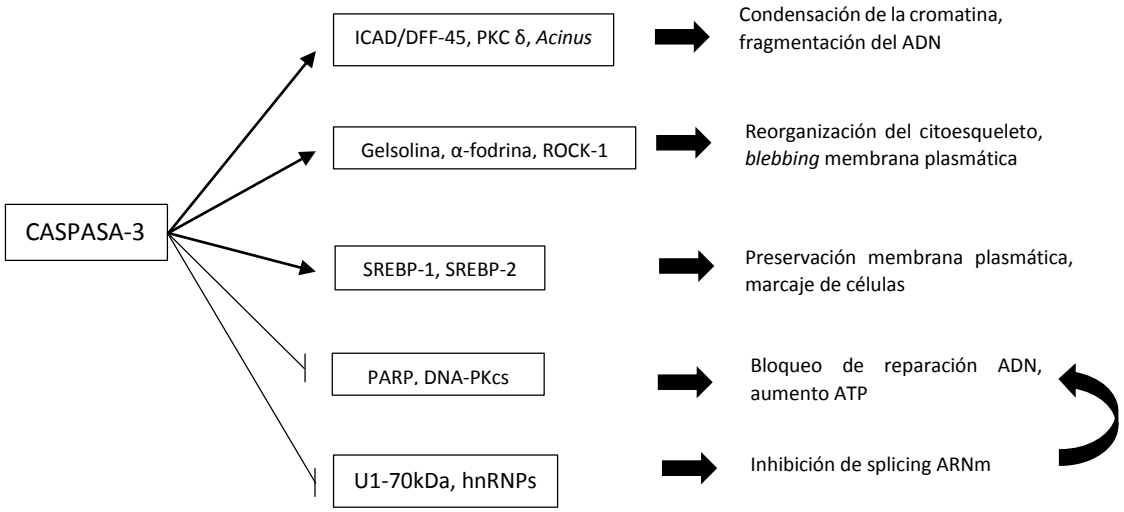

Figura 27. Representación esquemática de los sustratos escindidos por la caspasa-3 y su implicación funcional en la apoptosis.

La caspasa-7 es otra proteína fundamental en la fase de ejecución de la apoptosis, aunque su función en esta ruta de señalización no ha sido tan estudiada como en el caso de la caspasa-3. Igual que la caspasa-3, la caspasa-7 puede ser escindida y activada por las caspasas iniciadoras a través de la vía mediada por receptor (caspasa-8, caspasa-10) o a través de la vía mitocondrial (caspasa-9). Su actividad también puede ser inhibida por las proteínas IAPs, especialmente la survivina (Shin *et al*., 2001) y XIAP (Chai *et al*., 2001).

La caspasa-7 comparte el mismo centro activo (QACRG) y la misma especificidad de sustrato (DEVD) que la caspasa-3. Es por este motivo que ambas proteínas fueron consideradas como redundantes a la hora de escindir sustratos para el desensamblaje celular durante la apoptosis. De este modo, ratones deficientes en caspasa-3 y caspasa-7 (casp3$^{-/-}$ casp7$^{-/-}$) mueren en un corto período de tiempo tras el nacimiento, mientras que aquellos deficientes en caspasa-3 (casp3$^{-/-}$) o en caspasa-7 (casp7$^{-/-}$) desarrollan una vida normal. Estos hallazgos indican que la ausencia de una caspasa puede ser suplida por la otra. No obstante, evidencias bioquímicas y fisiológicas indican que la caspasa-7 difiere en algunos aspectos de la caspasa-3. La caspasa-3 es mucho más promiscua a la hora de escindir sustratos, considerándose como la caspasa ejecutora principal, mientras que la caspasa-7 es más selectiva y ejerce un papel más especializado en la fase de demolición celular (Lamkanfi & Kanneganti, 2010; Slee, Adrain & Martin, 2001; Walsh *et al*., 2008).

- ***Contexto genómico.***

CASP3

El gen *CASP3* se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 4 (4q34) y contiene un total de 8 exones. La posición exacta se muestra en la Figura 28.

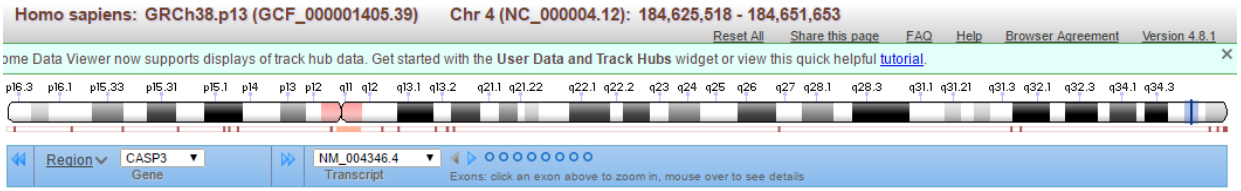

Figura 28. Localización cromosómica del gen *CASP3*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

En este trabajo se estudiaron tres marcadores genético-moleculares presentes en el gen que codifica para la caspasa-3: rs1049216, rs2705897 y rs4647603. El rs1049216 se encuentra situado en la región 3´UTR del gen *CASP3*, y supone el cambio de la variante ancestral A por G (FWD). Por otra parte, el rs4647603 se encuentra situado en la región promotora o 5´UTR del gen y supone el cambio C por T (FWD). Puesto que se trata de dos SNPs situados en regiones reguladoras, el cambio de una variante alélica por otra podría implicar cambios funcionales afectando a la expresión génica. Finalmente, el rs2705897 implica un cambio de la variante T por G (FWD) y aparece localizado en el intrón 5, lo cual podría afectar al *splicing* del ARNm (Sherry *et al*., 2001).

El rs1049216 (*CASP3*) se trata de un SNP, en general, bastante polimórfico, con una frecuencia del alelo menor (MAF) G de 0,40. No obstante, existe una gran variabilidad en función del tipo de población estudiada. Así, la frecuencia media de este alelo en poblaciones africanas es de 0,13, mientras que en aquellas del Este Asiático es de 0,81. Europa es, después de África, el continente con menos polimorfismo, con una frecuencia del alelo G inferior a 0,30 en todas las poblaciones (Fig. 29) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

Para el rs2705897 (*CASP3*), la frecuencia del alelo menor (MAF) T a nivel global es de 0,41. En poblaciones europeas la distribución de frecuencias para ambos polimorfismos es idéntica, lo que hace pensar en un desequilibrio de ligamiento completo entre estos dos marcadores. Aunque en poblaciones africanas es en dónde estos dos SNPs parecen alejarse más, en general la distribución de frecuencias alélicas de ambos polimorfismos son muy similares en todos los grupos poblacionales (Fig. 29) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

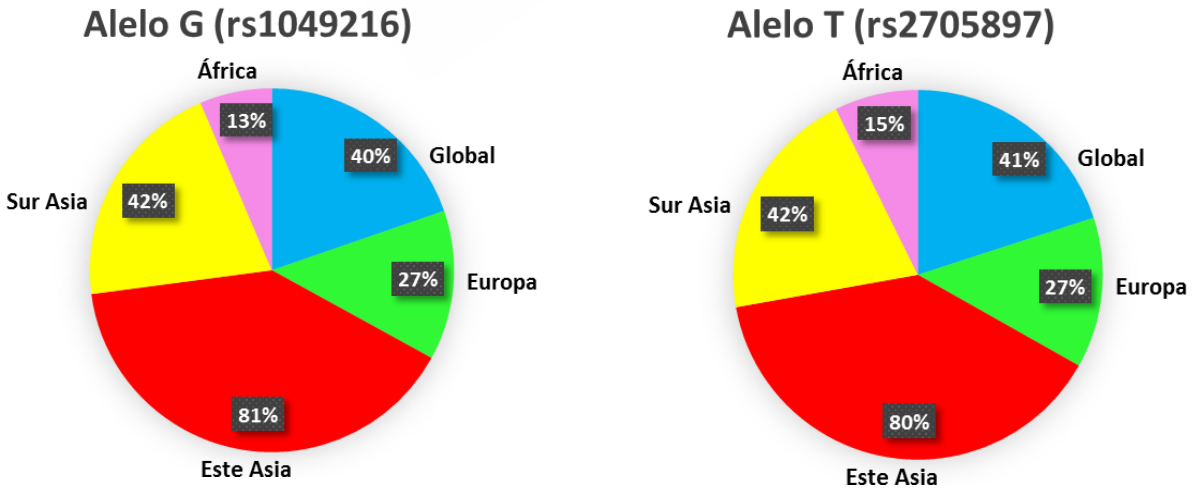

Figura 29. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs1049216 (*CASP3*) y rs2705897 (*CASP3*) según la frecuencia del alelo menor G y T, respectivamente. Basadas en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

Por el contrario, el rs4647603 (*CASP3*) presenta un grado de polimorfismo muy bajo a nivel global, con una frecuencia del alelo menor (MAF) T de 0,06. De hecho, este SNP es monomórfico en las poblaciones del Este de Asia y en algunas africanas. En el Sur de Asia existe bastante homogeneidad entre poblaciones, con una frecuencia media del 7%. En lo que respecta a Europa, se trata del continente con una frecuencia del alelo T más elevada a nivel global (0,15) (Fig. 30) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

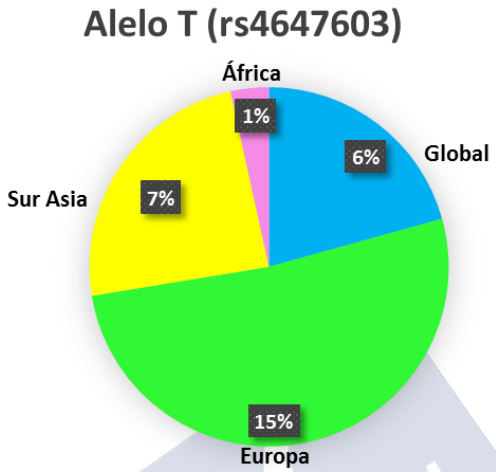

Figura 30. Variabilidad poblacional del rs4647603 (*CASP3*) según la frecuencia del alelo menor T. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

CASP7

El gen *CASP7* se ubica en el brazo largo del cromosoma 10, concretamente en la banda 10q25.3. Contiene un total de 7 exones y su posición exacta en el cromosoma se detalla en la Figura 31.

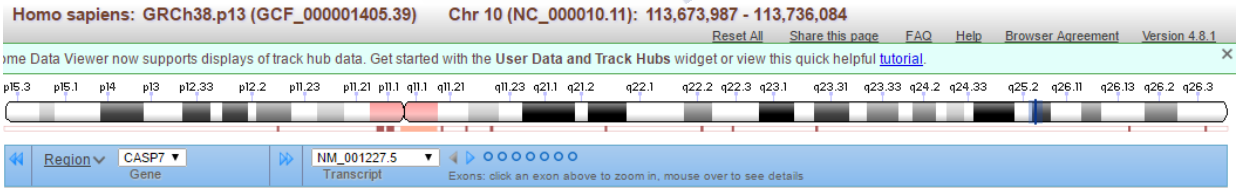

Figura 31. Localización cromosómica del gen *CASP7*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

En este trabajo se estudia el polimorfismo rs11196418 del gen *CASP7*, el cual supone el cambio de la variante ancestral G por A (FWD). Se encuentra situado en la región promotora, de modo que el cambio de una variante alélica por otra podría afectar al sitio de unión de algún factor de transcripción, dando lugar a una expresión génica diferencial (Sherry *et al.*, 2001).

El grado de polimorfismo del rs11196418 no es muy elevado a nivel global, con una frecuencia del alelo menor (A) de 0,10. En África este alelo presenta una frecuencia especialmente baja, con una media del 2%. Para poblaciones del Este Asiático existe bastante homogeneidad, con una frecuencia a nivel global del 11%. Grupos poblacionales europeos y del Sur Asiático son los que presentan un mayor grado de polimorfismo (0,16 y 0,18, respectivamente) (Fig. 32) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

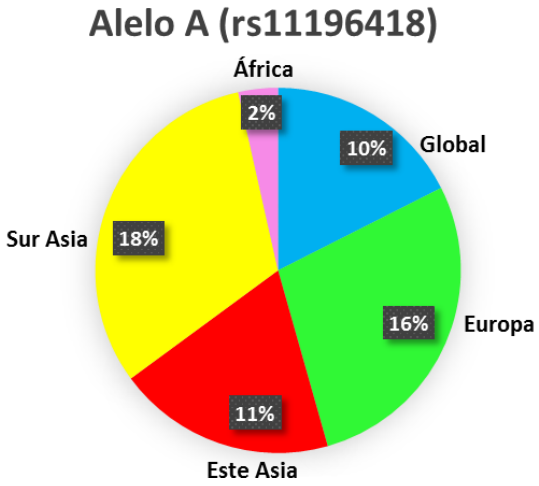

Figura 32. Variabilidad poblacional del rs11196418 (*CASP7*) según la frecuencia del alelo menor A. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

En varios tipos tumorales humanos se han detectado mutaciones somáticas en la caspasa-3, incluyendo carcinoma de colon, cáncer de pulmón, linfoma de no-Hodgkin, carcinoma de estómago, carcinoma hepatocelular o mieloma múltiple (Soung *et al*., 2004). Del mismo modo, se han descrito mutaciones somáticas en la caspasa-7 para cáncer de colon, carcinoma de esófago y cáncer de cabeza y cuello (Soung *et al*., 2003). La mayoría de estas mutaciones son inactivantes y muestran una capacidad apoptótica reducida o nula en relación a los genotipos salvajes, sugiriendo que la inhibición de la apoptosis por dichas alteraciones pueden jugar un papel importante en la tumorigénesis (Soung *et al*., 2003; Soung *et al*., 2004).

El nivel de expresión de las caspasas en tejidos tumorales ha resultado ser diferente de su expresión en tejidos normales. Se ha encontrado una reducción en la expresión de la caspasa-3 en neuroblastoma pediátrico (Wang & Zheng, 2004), cáncer de mama (Devarajan *et al*., 2002), carcinoma gástrico (Isobe *et al*., 2004) y carcinoma hepatocelular (Fujikawa *et al*., 2000). En lo que respecta a la caspasa-7, se ha encontrado una reducción de su expresión en carcinoma de colon (Palmerini, Devilard, Jarry, Birg & Xerri, 2001), cáncer gástrico (Yoo *et al*., 2004) y cáncer de mama (Hu, Zhou, Li, Wu & Gao, 2007).

La pérdida de expresión de la caspasa-3 se ha asociado con la resistencia a la apoptosis y la resistencia a la terapia en una variedad de tipos tumorales (Persad *et al*., 2004). Paradójicamente, se ha visto que, tanto la caspasa-3 como la caspasa-7, también tienen la capacidad de promover la proliferación en células circundantes a aquellas que están muriendo por medio de la liberación de PGE_2. Esta PGE_2 activa la señalización Wnt/β-catenina y promueve la repoblación de estas células tumorales, dando lugar a la resistencia tumoral a la terapia (Shalini *et al*., 2015).

La evaluación inmunohistoquímica de la próstata ha demostrado que la expresión de la caspasa-3 se correlaciona con el tipo celular y la fisiología, con una mayor inmunoreactividad en células secretoras que basales (Krajewska *et al*., 1997). Otro estudio pone de manifiesto que la expresión de la caspasa-3 es reducida en adenocarcinomas prostáticos pobremente y moderadamente diferenciados en comparación con los adenocarcinomas bien diferenciados

y la próstata normal (Winter, Kramer, Borkowski & Kyprianou, 2001). Esto sugiere que la disminución de la expresión de la caspasa-3 podría estar implicada tanto en el desarrollo como en la progresión del carcinoma prostático.

El gen *CASP3* es altamente polimórfico, y estudios epidemiológicos han desvelado la asociación de alguno de estos SNPs con el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Se ha estudiado la asociación de los genotipos correspondientes al marcador rs1049216 con la menor o mayor susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de cánceres. Aunque no se ha encontrado ninguna asociación con el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (Lin *et al*., 2016) o carcinoma hepatocelular (Deng *et al*., 2016), sí se han desvelado resultados positivos al analizar este marcador en el linfoma de no-Hodking, hallando que la variante alélica G resulta protectiva frente a este tipo de cáncer (Lan *et al*., 2007). En el mieloma múltiple, la variante alélica G en homocigosis también parece presentar un efecto protector, aunque los resultados rozan la significación estadística (Hoosgood *et al*., 2008). Por el contrario, aunque la asociación no es significativa, en carcinoma de esófago la variante alélica G parece presentar un comportamiento de riesgo (Zhang *et al*., 2012).

En cuanto al rs2705897 (*CASP3*), se han llevado a cabo dos estudios en cáncer de pulmón. Aunque en el trabajo de Lee y colaboradoes (2010) no se encuentra ninguna asociación con esta enfermedad, el publicado por Jang y colaboradores (2008) revela que aquellos individuos portadores de la variante alélica G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentan cierta protección frente al cáncer de pulmón.

En lo que respecta al rs4647603 (*CASP3*), un estudio publicado en población Caucasoide estadounidense no encuentra ninguna asociación con el carcinoma de esófago. No obstante, cuando se analizó este SNP en bloque con otros cercanos (rs4647601-rs4647602-rs4647603) se observó que los individuos con los haplotipos AGC y CGT eran más susceptibles a desarrollar este cáncer (Chen *et al*., 2008).

Hasta el momento solo se ha publicado un estudio de asociación entre el rs11196418 del gen *CASP7* y la susceptibilidad al carcinoma. En este trabajo, llevado a cabo en mujeres de población china, se ha descrito un efecto protector del genotipo AA, con respecto del GG, frente al desarrollo de carcinoma endometrial (Xu *et al*., 2009).

En cuanto al cáncer de próstata, hasta el momento no se ha publicado ningún estudio valorando su asociación con los polimorfismos rs1049216 o rs2705897 en el gen *CASP3* ni con el rs11196418 en el gen *CASP7*. El estudio llevado a cabo en población de Galicia, sería, por lo tanto, el primero en valorar la asociación de estos polimorfismos con el desarrollo del cáncer de próstata. En relación al rs4647603, un ensayo efectuado en población de la India ha revelado que aquellos individuos portadores de la variante alélica C, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentan un riesgo incrementando a padecer este tipo tumoral (Mittal, Mittal, Singh & Mandal, 2012).

1.4.3. Fas-Fasl.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

El sistema de señalización FAS/FASL desempeña un papel fundamental en el inicio de la vía extrínseca de la apoptosis, la cual se desencadena cuando el ambiente extracelular es desfavorable, siendo responsable de la eliminación de células infectadas por virus, células tumorales o injertos celulares foráneos, entre otros. Aunque la vía extrínseca puede ser activada por un elevado número de receptores de membrana y sus ligandos correspondientes, la llevada a cabo por el receptor FAS y su ligando FASL cobra especial relevancia al encargarse de la vigilancia inmunitaria del cáncer (Alberts *et al*., 2016; Lodish *et al*., 2005; Savitskaya & Onishchenko, 2015; Wein *et al*., 2008).

El receptor FAS (CD95) es una glucoproteína de membrana tipo I con un peso aproximado de 48 kDa y una longitud total de 319 aa. Pertecene a la superfamilia TNFR (*tumor necrosis factor receptor)* y en el extremo N-terminal presenta tres dominios ricos en cisteína (CRDs), fundamentales para el reconocimiento del ligando. Tras el dominio asociado a la membrana plasmática, en el extremo C-terminal, el receptor FAS presenta un dominio de muerte (DD) que se asocia con proteínas adaptadoras y se encarga de transmitir la señal apoptótica al interior de la célula (Fig. 33) (Nagata & Golstein, 1995; Nagata, 1997; Orlinick, Vaishnaw & Elkon, 1999; Villa-Morales & Fernández-Piqueras, 2012).

El ligando específico para el receptor FAS es el FASL (CD95L), una proteína de membrana tipo II con un total de 281 aa y un peso de 40 kDa que pertenece a la superfamilia TNF. La región N-terminal de la proteína es un dominio rico en prolina mientras que la región C-terminal es un dominio de homología con la familia TNF (THD), el cual permite la autoasociación en un compacto ligando homotrimérico que interactúa con FAS a través de los CRDs (Fig. 33) (Nagata & Golstein, 1995; Nagata, 1997; Orlinick *et al*., 1999; Villa-Morales & Fernández-Piqueras, 2012).

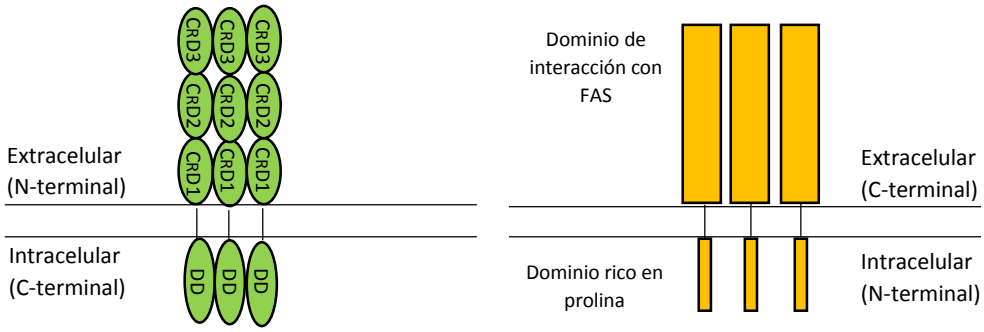

Figura 33. Estructura de las proteínas de membrana FAS (izquierda) y FASL (derecha).

Además de las formas asociadas a la membrana, estas proteínas pueden aparecer como formas secretadas en el medio extracelular. Las formas solubles de FAS (sFAS) se producen por medio de *splicing* alternativo del ARNm, mientras que las formas solubles de FASL (sFASL) se originan postraduccionalmente. Ambas proteínas solubles funcionan como

inhibidoras del proceso de apoptosis al actuar como competidoras de las formas asociadas a la membrana (Owen-Schaub, Chan, Cusack, Roth & Hill, 2000; Sharma *et al*., 2000; Timmer, de Vries & de Jong, 2002; Villa-Morales & Fernández-Piqueras, 2012).

La expresión de FAS es ubicua en la mayoría de los tejidos, tanto de estirpe linfoide como no linfoide. Sin embargo, la expresión de FASL aparece restringida a linfocitos T activados, células *natural killer* (NK), células B, fagocitos y órganos inmuno-privilegiados como los ojos, el cerebro, la placenta o los órganos reproductores. El daño causado por una reacción inflamatoria en estas zonas podría ser peligrosa para la supervivencia del organismo, de modo que la expresión del FASL les permite gozar de un privilegio inmune al inducir la apoptosis de los linfocitos T inflamatorios infiltrantes que expresan FAS (Maher, Toomey, Condron & Bouchier-Hayes, 2002; O´Connell, Bennett, O´Sullivan, Collins & Shanahan, 1999; Timmer *et al*., 2002).

Aunque el sistema FAS/FASL juega papeles en otras respuestas celulares, su principal función es iniciar la vía extrínseca de señalización apoptótica. Esta ruta es responsable de llevar a cabo la muerte celular inducida por activación (AICD), un proceso diseñado para eliminar los linfocitos T activados que ya no son necesarios después de una respuesta inmune. El contacto de los linfocitos T con el antígeno provoca un aumento en la expresión de FAS y FASL que los hace sensibles a la apoptosis. Además de garantizar una correcta homeostasis de las células T periféricas, la señalización FAS/FASL también está involucrada en la selección negativa de células T inmaduras autorreactivas durante su desarrollo en el timo. De acuerdo con estas funciones, ratones *lpr* (*lymphoproliferation*) y *gld* (*generalized lymphoproliferative disorder*), mutantes homocigotos en *Fas* y *Fasl*, respectivamente, son propensos a desarrollar enfermedades autoinmunes e incluso muerte prematura (Nagata & Golstein, 1995; Sharma *et al*., 2000; Villa-Morales & Fernádez-Piqueras, 2012).

Además, el sistema FAS/FASL participa en la citotoxicidad mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y células *natural killer* para eliminar aquellas células que presentan infecciones por patógenos o células transformadas oncogenéticamente. Su papel en el marco de la carcinogénesis se comentará con más detalle en un apartado posterior (Nagata & Golstein, 1995; Sharma *et al*., 2000; Villa-Morales & Fernádez-Piqueras, 2012).

La vía de señalización apoptótica mediada por el sistema FAS/FASL se muestra en la Figura 34. En primer lugar, las moléculas del receptor FAS se preasocian en homotrímeros en la superficie celular a través del CRD1. Tras la unión del FASL, los receptores quedan activados y pueden reclutar moléculas adaptadoras FADD por medio de interacciones homotípicas entre los DD de ambas moléculas. Además de un dominio DD en su extremo C-terminal, la molécula FADD posee un dominio DED en el extremo N-terminal mediante el cual puede reclutar moléculas de procaspasa-8. El sistema formado por FAS-FADD-procaspasa-8 forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). La proximidad entre las moléculas de procaspasa-8 dirige su escisión autocatalítica para dar lugar a la caspasa-8 madura. Esta caspasa activa se disocia entonces del complejo para procesar las caspasas ejecutoras (-3, -6, -7) (Curtin & Cotter, 2003; Kaufmann, Strasser & Jost, 2012; Nagata, 1997; Orlinick *et al*., 1999; Peter & Krammer, 2003; Villa-Morales & Fernádez-Piqueras, 2012).

Aunque la caspasa-10 podría tener un papel homólogo a la caspasa-8, esta última parece desempeñar un rol más principal, ya que células deficientes en caspasa-10 experimentan apoptosis de forma normal, pero células deficientes en caspasa-8 presentan resistencia a la apoptosis mediada por FAS. En función del modo de activación de las caspasas ejecutoras, se

pueden distinguir dos tipos celulares: I y II (Fig. 34) (Curtin & Cotter, 2003; Kaufmann *et al*., 2012; Nagata, 1997; Orlinick *et al*., 1999; Peter & Krammer, 2003; Villa-Morales & Fernádez-Piqueras, 2012).

En las células de tipo I existe suficiente cantidad de caspasa-8 activada como para escindir directamente a las caspasas ejecutoras. No obstante, en las células de tipo II el proceso de formación del DISC es más lento, por lo que la activación de la caspasa-8 también se ralentiza. En estas células se necesita la amplificación de la señal por medio de la inducción de la vía intrínseca o mitocondrial, lo cual se consigue porque la caspasa-8 escinde y activa la proteína Bid. La forma truncada de Bid (tBid) se dirige a la mitocondria, inhibe a miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y permite, a su vez, la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bax, los cuales forman canales de membrana. Esto favorece la liberación de proteínas desde el espacio intermebrana al citosol, entre ellas SMAC/DIABLO, Omi y, sobre todo, el citocromo *c*. Este último recluta moléculas de Apaf-1, dATP y procaspasa-9 para formar el apoptosoma, plataforma en donde se produce la activación de la caspasa-9. Esta proteína dirige finalmente la liberación de moléculas de caspasa-3 maduras, que activarán los sustratos necesarios para llevar a cabo los cambios morfológicos que desencadenarán la muerte celular (Fig. 34) (Curtin & Cotter, 2003; Fernández-Piqueras, 2012; Kaufmann *et al*., 2012; Nagata, 1997; Orlinick *et al*., 1999).

Las células también pueden ser clasificadas en tipo I o II en función del nivel de expresión de XIAP. En células de tipo I la expresión de XIAP es baja o ausente, de modo que la caspasa-8 puede activar directamente las caspasas-3 y -7. No obstante, en células de tipo II la expresión de XIAP es elevada, de modo que las caspasas ejecutoras estarán inhibidas por esta proteína. Por lo tanto, en este caso, la caspasa-8 debe escindir Bid, lo cual permite la liberación del espacio intermembrana de moléculas inhibidoras de XIAP como SMAC/DIABLO. La neutralización de XIAP permite entonces la activación de las caspasas-3 y -7 para completar el proceso de demolición celular (Kantari & Walczak, 2011).

La apoptosis mediada por FAS/FASL también puede ser activada por medio de otras dos vías independientes, las cuales involucran a las proteínas RIP/RAIDD o a la proteína DAXX (Fig. 2) (Curtin & Cotter, 2003; Sharma *et al*., 2000).

Se ha visto, además, una relación con el p53, en tanto que el gen *FAS* presenta elementos de respuesta a este gen (*p53RE*) en la región promotora e intrón 1. De este modo, ante un daño en el ADN, el p53 puede aumentar la expresión del gen *FAS*, favoreciendo la apoptosis. Además de esta función, el p53 parece participar en el tráfico de FAS desde el aparato de Golgi a la superficie celular (Curtin & Cotter, 2003; Nagata, 1999; Timmer *et al*., 2002; Waring & Müllbacher *et al*., 1999).

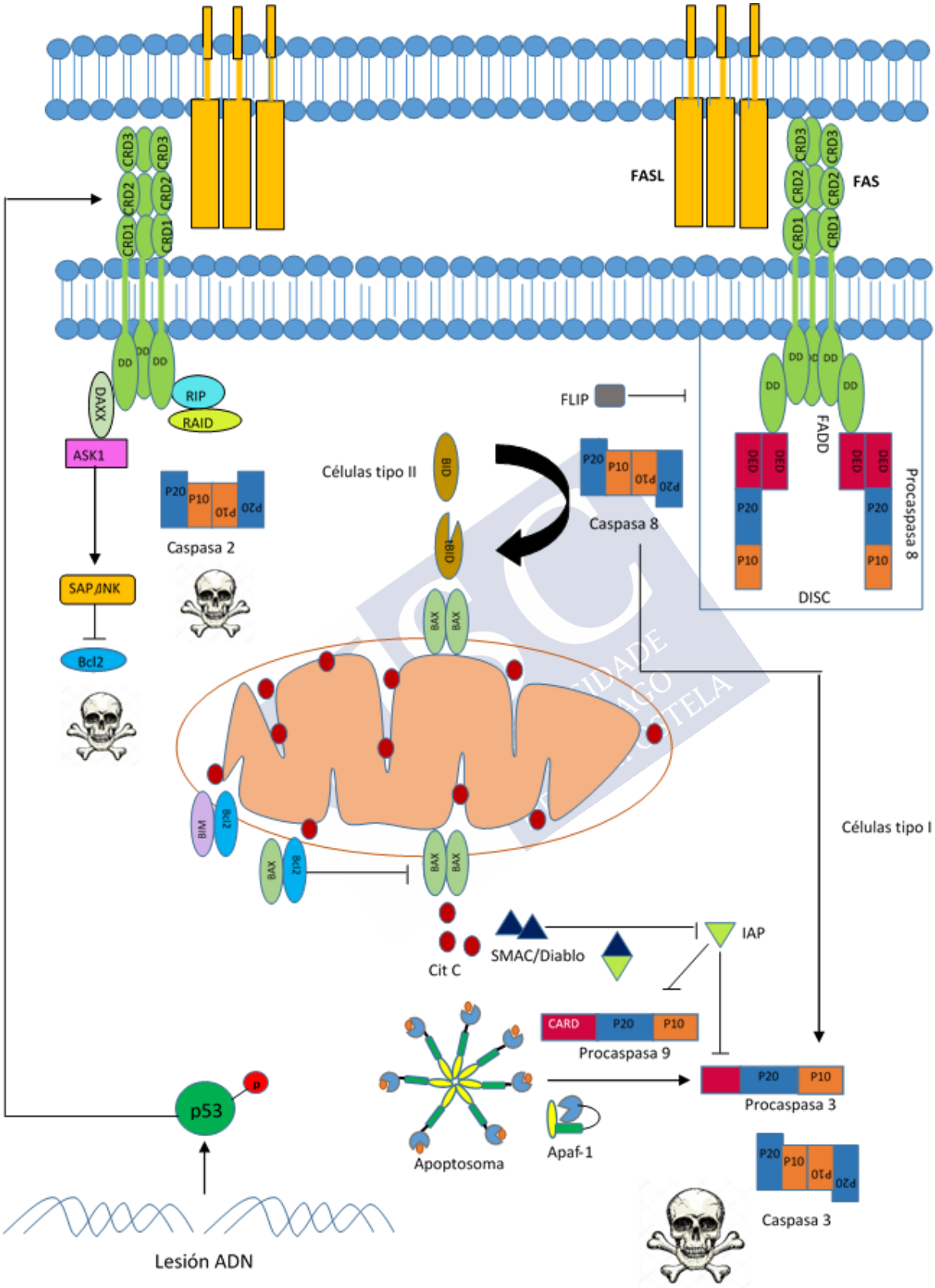

Figura 34. Vía de señalización mediada por el sistema FAS/FASL.

- ***Contexto genómico.***

FAS

El gen *FAS* está formado por un total de 9 exones y se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23.31), concretamente en la posición referenciada en la Figura 35. Se trata de un gen altamente polimórfico, con un elevado número de SNPs en su secuencia. En este trabajo se han estudiado los siguientes: rs1800682, rs3740286 y rs10509561.

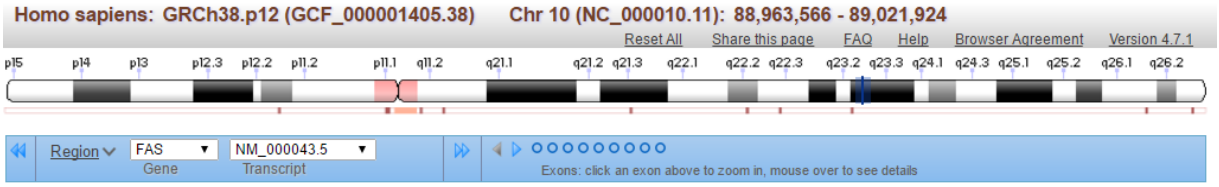

Figura 35. Localización cromosómica del gen *FAS*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

rs1800682 (*FAS*)

El rs1800682 (-670 A>G) se encuentra localizado en la región promotora del gen, en la región *enhancer*, concretamente en la posición -670, e involucra el cambio de la variante alélica A por G (FWD) (Sherry *et al.*, 2001). El alelo A configura la secuencia consenso GAS (*gamma-interferon activation sequence*), la cual favorece la expresión génica de FAS a través de la vía INF-ɣ-STAT1. En respuesta al INF-ɣ secretado por las células del sistema inmune, el factor de transcripción STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) se transloca al núcleo para unirse a la secuencia GAS (CCAG**A**AA), permitiendo la activación transcripcional del gen *FAS*. Varios estudios han descrito que la variante G destruye la secuencia GAS, por lo que el factor STAT1 no se puede unir a esta región, o lo hace con menos afinidad, teniendo como consecuencia una menor actividad del promotor y una disminución en la expresión génica de FAS (Huang, Morris & Manolios, 1997; Huang *et al.*, 2016; Kanemitsu *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2003; QIAGEN; Tan, Ismail, Duski, Othman & Ankathil, 2017).

El rs1800682 presenta un elevado grado de polimorfismo a nivel global, con una frecuencia del alelo menor A de 0,45. Este alelo pasa a ser el mayoritario en poblaciones europeas y del Sur Asiático, con unas frecuencias globales de 0,57 y 0,55, respectivamente. En el Este de Asia existen grandes diferencias entre distintas poblaciones, oscilando desde una frecuencia de 0,44 hasta 0,62. Con lo que respecta al continente Africano, el SNP es poco polimórfico con frecuencias del alelo A inferiores al 30% en todas las poblaciones (Fig. 36).

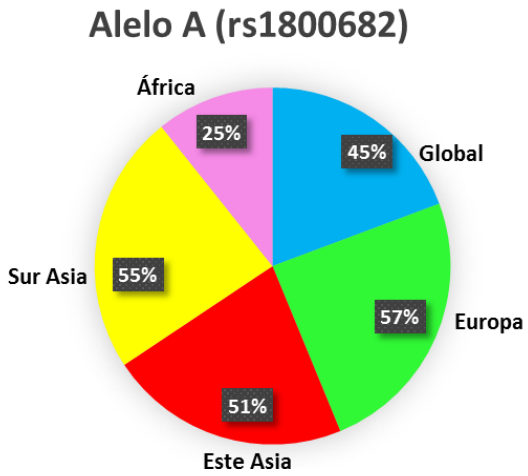

Figura 36. Variabilidad poblacional del rs1800682 (*FAS*) según la frecuencia del alelo menor A. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium*, 2015.

rs3740286 y rs10509561 (*FAS*)

Por otra parte, los polimorfismos rs3740286 y rs10509561 se localizan en el intrón 1 del gen *FAS* y suponen cambios A>G (FWD) y T>A (FWD), respectivamente. El intrón 1 se transcribe en dirección opuesta para dar lugar al RNA antisentido FAS-AS1, el cual no codifica para proteína, pero puede regular la expresión génica de *FAS* a través del *splicing* del pre-ARNm.

En el artículo de Yan y colaboradores se ha visto que FAS-AS1 no influye en el nivel global de expresión de *FAS* a ARNm, pero sí que aumenta la expresión de formas solubles de FAS (Yan *et al*., 2005). De acuerdo con estos hallazgos, en el estudio de Villamizar y colaboradores (2016) con líneas celulares tumorales humanas, se ha propuesto que el FAS-AS1 podría guiar al SPF45, un componente de los complejos de *splicing*, a la región del pre-ARNm de FAS en la que se encuentra el exón 6, codificador del dominio de membrana, facilitando su eliminación. Esto conduciría a un incremento de la producción de formas sFAS, las cuales podrían bloquear el proceso apoptótico al secuestrar moléculas de FASL (Villamizar, Chambers, Riberdy, Persons & Wilber, 2016). No obstante, otros autores defienden que existe una relación inversa entre el FAS-AS1 y la producción de formas solubles de FAS debido a que este RNA secuestra al factor de *splicing* RBM5, el cual es responsable de la eliminación del exón 6 del gen *FAS* (Sehgal *et al*., 2014).

La variabilidad poblacional de los SNPs situados en el intrón 1 del gen *FAS* se muestra en la Figura 37. El rs3740286 presenta, a nivel global, una frecuencia del alelo menor G de 0,36. No obstante, este valor asciende hasta el 44% en poblaciones del Sur Asiático y hasta el 51% en aquellas del Este Asiático. En Europa se encuentran frecuencias alrededor del 40%, mientras que es notablemente inferior (18%) en grupos poblacionales africanos.

Por otra parte, el rs10509561 muestra un menor grado de polimorfismo que el rs3740286, tanto a nivel global (A: 0,21) como en las distintas poblaciones. En grupos del Este Asiático este SNP es prácticamente monomórfico, con una frecuencia media del alelo A de 0,03. La frecuencia del alelo A asciende hasta el 20% en grupos del Sur Asiático y hasta el 32% en

europeos. Las poblaciones africanas merecen especial atención porque el grado de polimorfismo de este SNP (0,22) es superior al encontrado para el rs3740286.

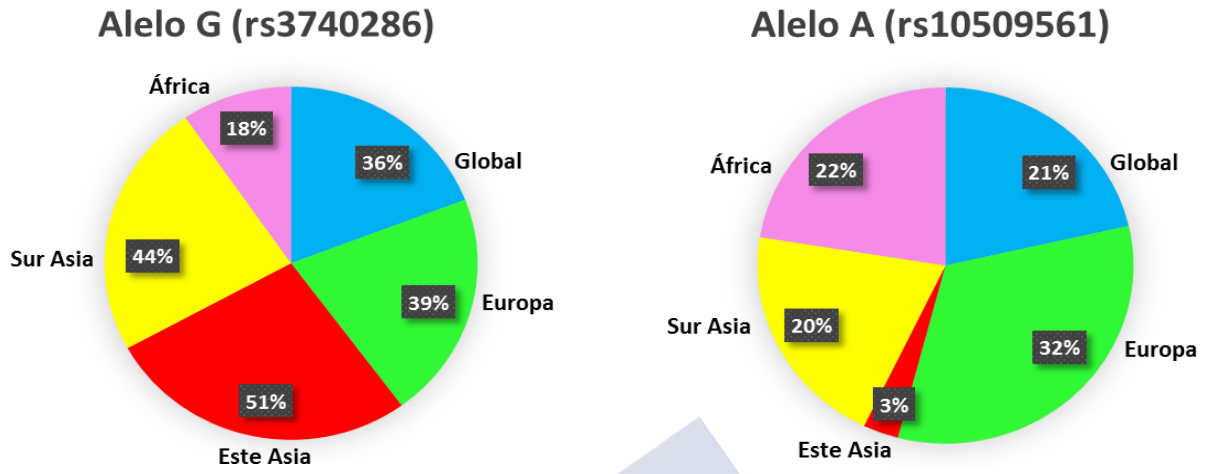

Figura 37. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs3740286 (*FAS*) y rs10509561 (*FAS*) según la frecuencia de los alelos menores G y A, respectivamente. Basadas en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

FASLG

En cuanto al gen *FASLG*, cuenta con un total de 4 exones y se ubica en el cromosoma 1 (1q24.3), de acuerdo con lo referido en la Figura 38.

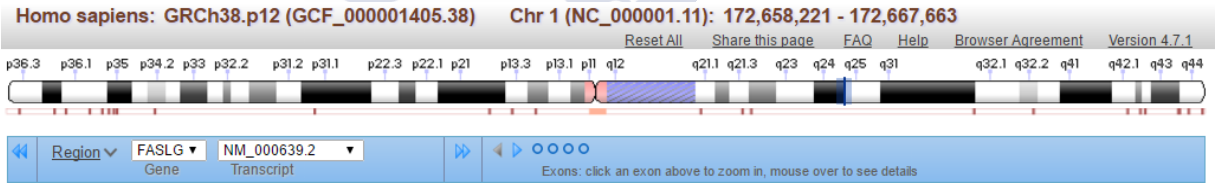

Figura 38. Localización cromosómica del gen *FASLG*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

rs763110 (*FASLG*)

En este trabajo se ha estudiado el marcador rs763110 (-844C>T) del gen *FASLG*. Se encuentra localizado en la región promotora o 5´UTR, concretamente en la posición 844 aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, e implica el cambio de la variante C por T (FWD) (Sherry *et al.*, 2011). El alelo C favorece la creación de un sitio de unión para el factor de transcripción C/EBPβ (CAAT/*ehancer binding protein* β). De acuerdo con esto, se ha visto un incremento en la expresión basal del gen *FASL* para fibrocitos en sangre periférica portadores del alelo C, con respecto de aquellos con la variante alélica T (Wu *et al.*, 2003).

En la Figura 39 se muestra la distribución de frecuencias correspondientes al rs763110. Aunque presenta un grado de polimorfismo a nivel global elevado, con una frecuencia del alelo menor (C) del 47%, se observan tendencias muy dispares entre las poblaciones mundiales. Este alelo es raro en población africana, con frecuencias inferiores al 10% en la mayoría de las regiones. Para el Sur Asiático, el alelo C sigue siendo minoritario, pero su frecuencia alcanza el 37% de media. En población Europea este alelo es el mayoritario, con una frecuencia media de 0,65, aunque presenta un amplio rango de variación (0,58-0,82). En el Este Asiático, la frecuencia del alelo C es homogénea entre poblaciones, con una media de 0,74.

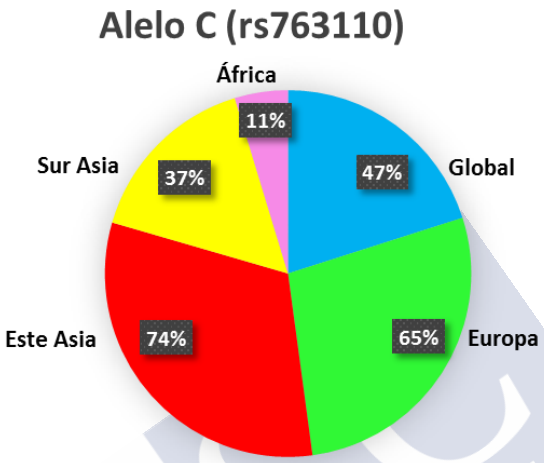

Figura 39. Variabilidad poblacional del rs763110 (*FASLG*) según la frecuencia del alelo menor C. Basado en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

El sistema FAS/FASL juega un papel fundamental en la carcinogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células *natural killer* (NK) representan mecanismos de respuesta inmune contra el desarrollo de células cancerígenas al reconocer antígenos específicos tumorales. Estas células del SI pueden eliminar las células potencialmente tumorales por medio de dos sistemas: el sistema perforina-granzima o el sistema FAS/FASL (Fig. 40). Dado que todas las líneas celulares, incluidas las tumorales, expresan el receptor FAS, células indeseadas pueden ser eliminadas por medio de apoptosis gracias a la unión de este receptor con el FASL expresado en células CTL y NK. La protección frente al desarrollo tumoral se ve favorecido gracias a la liberación del INF-ɣ, el cual aumenta la expresión del receptor FAS en la célula diana, así como de componentes del MHC-I (*major histocompatibility complex class I*) para hacer a las células tumorales más identificables por el sistema inmune (Müschen, Warskulat & Beckmann, 2000; O´Brien *et al*., 2005; O´Connell *et al*., 1999; Owen-Schaub *et al*., 2000; Peter *et al*., 2015).

No obstante, los tumores han desarrollado mecanismos para suprimir la respuesta inmune y continuar proliferando. Tales estrategias pueden ser defensivas, como el desarrollo de resistencia a FAS, u ofensivas como la expresión de FASL (Fig. 40). Se ha visto que la mayoría de las células cancerígenas presentan resistencia a la apoptosis mediada por FAS, que podría protegerlas de su eliminación por respuestas anti-tumorales, evadiendo la vigilancia inmune.

La disminución en la expresión del receptor FAS es el principal mecanismo de escape inmune y se ha asociado con el desarrollo de distintos tipos tumorales. La secreción de formas solubles de FAS (sFAS) actuarían como competidoras de FAS por el FASL en el medio extracelular, antagonizando el sistema y aumentando también la resistencia a la apoptosis. De acuerdo con esto, se han encontrado niveles elevados de sFAS en el suero de pacientes con cáncer, incrementándose con el grado tumoral, por lo que podrían ejecer un papel importante en la carcinogénesis (Curtin & Cotter, 2003; Nagata, 1999; O´Brien *et al*., 2005; O´Connell *et al*., 1999; Owen-Schaub *et al*., 2000; Timmer *et al*., 2002; Waring & Müllbacher, 1999).

Por otra parte, se ha visto que muchas líneas celulares tumorales pueden expresar *de novo* FASL, lo cual podría convertir al tejido cancerígeno en un sitio inmunoprivilegiado, en donde se produciría la apoptosis de los linfocitos de infiltración tumoral (TILs) sensibles a FAS (Fig. 40). Este mecanismo se conoce como contrataque inmune. Los linfocitos T se activan después del contacto con los antígenos tumorales, lo cual aumenta su expresión de FAS y por tanto su sensibilidad a la apoptosis. El contrataque inmune se produce en células resistentes a FAS (para evitar el suicidio tumoral) y parece estar más implicado en la progresión carcinogénica y la metástasis que en la propia formación del tumor. De hecho es frecuente que muchas células tumorales inviertan su patrón de expresión en estos genes (FAS^-, $FASL^+$) con respecto a las equivalentes no tumorales (FAS^+, $FASL^-$) (Maher *et al*., 2002; Müschen *et al*., 2000; O´Brien *et al*., 2005; O´Connell *et al*., 1999; Peter *et al*., 2015).

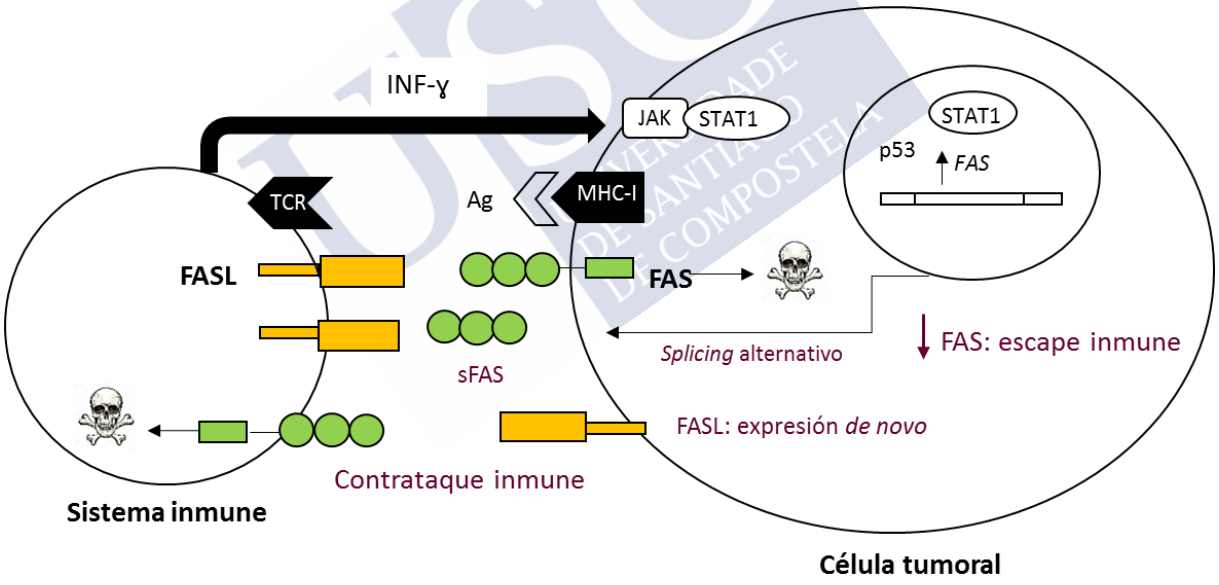

Figura 40. Mecanismos reguladores de la vía FAS/FASL.

Con respecto del papel que desempeña esta vía de señalización en la etiología del PCa, se ha visto que el receptor FAS aparece expresado tanto en líneas celulares sanas de próstata humana como en líneas celulares de cáncer de próstata (Rokhlin *et al*., 1997). No obstante, se ha descrito un aumento en la expresión de FAS y FASL en tejidos prostáticos neoplásicos (PIN de alto grado y adenocarcinoma), comparado con la expresión en glándulas benignas (Jiang *et al*., 2002).

Además, los individuos diagnosticados con PCa presentan niveles significativamente más elevados de formas solubles de FAS (sFAS) que aquellos con hiperplasia benigna de próstata, una observación que se acentúa en pacientes metastásicos, asociándose con un mal prognóstico (Furuya, Fuse & Masai, 2001; Furuya, Nagakawa & Fuse, 2003). De acuerdo con el aumento en la formas solubles, se ha descrito una sobreexpresión del factor de *splicing* SPF45 en carcinoma de próstata, pudiendo jugar un papel en la proliferación, la resistencia a la quimioterapia, la migración y la invasión (Villamizar *et al*., 2016). En resumen, una alteración en la funcionalidad del sistema FAS/FASL podría jugar un papel fundamental en el desarrollo y la progresión de la carcinogénesis prostática.

rs1800682 (*FAS*)

Se han publicado un elevado número de estudios valorando la interacción del polimorfismo rs1800682 con el desarrollo de distintos tipos de cáncer en poblaciones de diverso transfondo genético.

En algunos de ellos no se ha encontrado asociación del polimorfismo rs1800682 con la carcinogénesis (Bye *et al*., 2011; Chatterjee *et al*., 2009; Crew *et al*., 2008; Daripally, Nallapalle, Katta & Prasad, 2015; Dastmalchi, Safaralizadeh, Feizi & Pouladi, 2017; Gangwar & Mittal, 2010; Han *et al*., 2013; Huang *et al*., 2016; Karimi, Kapoor, Sharma & Das, 2013; Kim *et al*., 2010; Kupcinskas *et al*., 2011; Li *et al*., 2013; Li *et al*., 2006; Park *et al*., 2006; Pavlidou *et al*., 2016; Pérez, Barbisan, DiFranza, Contreras & Golijow, 2011; Qureshi, Nan, Dyer & Han, 2010; Sibley *et al*., 2003; Tong *et al*., 2012; Wang, Cheng, Spitz & Wei, 2003; Wang *et al*., 2010; Wang *et al*., 2016; Yang *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2010; Zhu *et al*., 2010; Zhu *et al*., 2010).

El alelo G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, se ha asociado con un aumento en la predisposición a desarrollar carcinoma de tiroides (Eun *et al*., 2015), carcinoma de cabeza y cuello (Zhang *et al*., 2006), cáncer cervical en población malaya (Tan *et al*., 2017) o carcinoma colorrectal (Wang *et al*., 2016). En mioma uterino (Mohammadpour-Gharehbagh *et al*., 2016), carcinoma de mama en población iraní (Nallapalle, Daripally & Prasad, 2015) o leucemia mieloide crónica (Edathara *et al*., 2016) el aumento en el riesgo se ha asociado exclusivamente con portadores del alelo G en homocigosis. Por el contrario, en otros estudios, el inicio de la carcinogénesis se ha vinculado con el genotipo homocigoto AA, como en carcinoma cervical para mujeres taiwanesas (Lai *et al*., 2003; Lai *et al*., 2005), cáncer de mama en mujeres chinas (Xu *et al*., 2014), leucemia de células T (Farre *et al*., 2008) o melanoma cutáneo (Li *et al*., 2006).

Se han publicado tres estudios valorando la interacción del rs1800682 con el cáncer de próstata: en población china (Shao *et al*., 2011), portuguesa (Lima *et al*., 2008) y del Norte de la India (Mandal & Mittal, 2012). El estudio llevado a cabo en población de Galicia sería, por lo tanto, el segundo publicado en población europea. Los resultados derivados de estos estudios no son concluyentes acerca de la influencia que presenta este polimorfismo en el desarrollo del PCa. En el trabajo llevado a cabo en población de etnia *Han Chinese* se ha desvelado un descenso en la susceptibilidad para los individuos con los genotipos AG y GG. Aunque en población portuguesa no se obtienen resultados estadísticamente significativos a nivel global, sí que se encuentra asociación al estratificar la muestra en función del estadio tumoral, detectandose una protección frente al PCa de invasión extracapsular del 72% para los individuos portadores del alelo G. En población india tampoco se describe asociación a nivel

global, pero se ha vinculado el alelo A con una disminución en la predisposición a las metástasis óseas.

rs3740286 y rs10509561 (*FAS*)

Hasta el momento no se han publicado estudios acerca de la influencia en la carcinogénesis de los polimorfismos rs3740286 y rs10509561. El análisis de estos SNPs en nuestra población aportará, por lo tanto, información inédita acerca de su influencia en la predisposición al cáncer, más concretamente, en el carcinoma de etiología prostática.

rs763110 (*FASLG*)

La bibliografía acerca de la relación del rs763110 con el inicio del cáncer es extensa, y ha sido estudiado en un elevado número de tipos tumorales y poblaciones de diversa ancestralidad.

En algunos trabajos no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo rs73110 y la oncogénesis (Cao *et al*., 2010; Chatterjee *et al*., 2009; Crew *et al*., 2007; Dalan *et al*., 2014; Eun *et al*., 2015; Jalali *et al*., 2018; Karimi *et al*., 2013; Kim *et al*., 2010; Kupcinskas *et al*., 2011; Lai *et al*., 2005; Li *et al*., 2006; Pérez *et al*., 2011; Rai *et al*., 2014; Wang *et al*., 2010; Wang *et al*., 2016; Wang *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2006; Zhou *et al*., 2010; Zhu *et al*., 2010).

Por otra parte, los individuos portadores del genotipo TT se han vinculado con un aumento en el riesgo de desarrollar carcinoma cervical (Wu *et al*., 2017), leucemia infantil (Tong *et al*., 2012), carcinoma hepatocelular (Khalifa, Bahgat, Darwish & Shahin, 2016), cáncer de esófago (Zhao, Zheng, Li & Wang, 2014) y diversos cánceres del sistema reproductor femenino, como el de mama, el cervical o el endometrial (Hashemi *et al*., 2013; Nallapalle *et al*., 2015).

Por el contrario, en otros estudios, se desvela un aumento en el riesgo de carcinoma para los portadores del genotipo CC. Tal es el caso del cáncer de ovario (Li *et al*., 2013), de mama (Wang *et al*., 2012; Wang *et al*., 2016; Xu *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2007) o de vejiga (Li *et al*., 2006), así como el neuroblastoma (Han *et al*., 2013), el melanoma (Qureshi *et al*., 2010), el cáncer de páncreas (Yang *et al*., 2008) o el cáncer de pulmón (Zhang *et al*., 2005; Zhao *et al*., 2016).

Hasta el momento solo se ha publicado un estudio acerca de la influencia del rs763110 en el desarrollo del cáncer de próstata. En este trabajo, llevado a cabo con población de etnia *Han Chinese*, no se obtiene asociación estadísticamente significativa con la enfermedad, aunque los resultados parecen indicar una mayor predisposición para los individuos portadores del genotipo TT (Shao *et al*., 2011). Nuestro estudio sería, por lo tanto, el primero en valorar la influencia de las variantes de este marcador en el desarrollo del cáncer de próstata en población de ancestralidad Caucasoide.

rs1800682 (*FAS*)-rs763110 (*FASLG*)

Del mismo modo, se ha valorado la interacción entre los polimorfismos localizados en el gen *FAS* y el *FASLG*. Los resultados que describen una influencia conjunta de los SNPs rs1800682 y rs763110 en el inicio del carcinoma son diversos, variando en función del tipo tumoral o población que sea objeto de estudio. De este modo, la combinación genotípica

rs1800682AA-rs763110TT se ha vinculado con un aumento en el riesgo a desarrollar distintos cánceres del sistema reproductor femenino (Nallapalle *et al*., 2015), pero se ha asociado con un descenso en la susceptibilidad al carcinoma oral (Karimi *et al*., 2013). Otros estudios desvelan un efecto de riesgo para la combinación genotípica AA-CC en el cáncer cervical (Lai *et al*., 2005) o en el cáncer de mama (Xu *et al*., 2014).

1.4.4. Familia IAPs.

Los inhibidores naturales más conocidos de la caspasas son las *IAPs* (*inhibitor of apoptosis proteins*), una familia de proteínas celulares originalmente identificadas en células de insecto infectadas por baculovirus. En humanos se han identificado un total de 6 miembros de la familia IAP: NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*), survivina y Bruce. Las IAPs se caracterizan por poseer un dominio baculoviral de 70-80 aminoácidos denominado BIR (*baculoviral IAP repeat*), de modo que todos los miembros de la familia contienen de 1 a 3 copias de este dominio en el extremo N-terminal. Los dominios BIR son estructuras tipo dedos de zinc que se pueden unir a la superficie de las caspasas, bloqueando los surcos catalizadores de estas proteasas. El dominio BIR3 interactúa con la caspasa-9, mientras que los dominios BIR2 y BIR1 se unen de forma selectiva a las caspasa-3 y -7. Se ha comprobado la existencia de dos moléculas anti-IAP (SMAC/DIABLO y Omi), las cuales son liberadas desde el espacio intermembrana mitocondrial cuando se activa la vía intrínseca, bloqueando las IAP en el citosol. Esto favorece la activación de las caspasas y permite el proceso de apoptosis (Alberts *et al*., 2016; Chowdhoury *et al*., 2008; Fan *et al*., 2005).

1.4.4.1. Survivina (*BIRC5*).

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La proteína survivina desempeña dos funciones importantes en la célula: garantizar la correcta división celular e impedir la muerte celular programada. Se trata del miembro más pequeño de la familia de proteínas IAP, con un peso molecular aproximado de 16,3 kDa y un total de 142 aa. En su extremo N-terminal contiene solo un dominio BIR, mientras que en el C-terminal posee una larga cola α-helicoidal (Fig. 41A). Se piensa que esta estructura guarda relación con su doble función en la apoptosis y la división celular, de modo que el dominio BIR sería fundamental en su capacidad anti-apoptótica mientras que el extremo COOH le permitiría translocarse al núcleo y unirse a los microtúbulos del huso mitótico (Athanasoula *et al*., 2014; Chiou, Jones & Tarnawski, 2003; Johnson & Howerth, 2004; Verdecia *et al*., 2000).

La estructura cristalina de la survivina revela un dímero en el cual los dos dominios BIR de cada mónomero se unen en regiones hidrofóbicas (Fig. 41B). Aunque originalmente se había considerado que la proteína existía solo en forma de homodímero, estudios recientes demuestran que las formas diméricas y monómericas coexisten, con el monómero ejerciendo una función principalmente anti-apoptótica y el homodímero asegurando la estabilidad del huso mitótico (Athanasoula *et al*., 2014; Chiou *et al*., 2003; Johnson & Howerth, 2004; Verdecia *et al*., 2000).

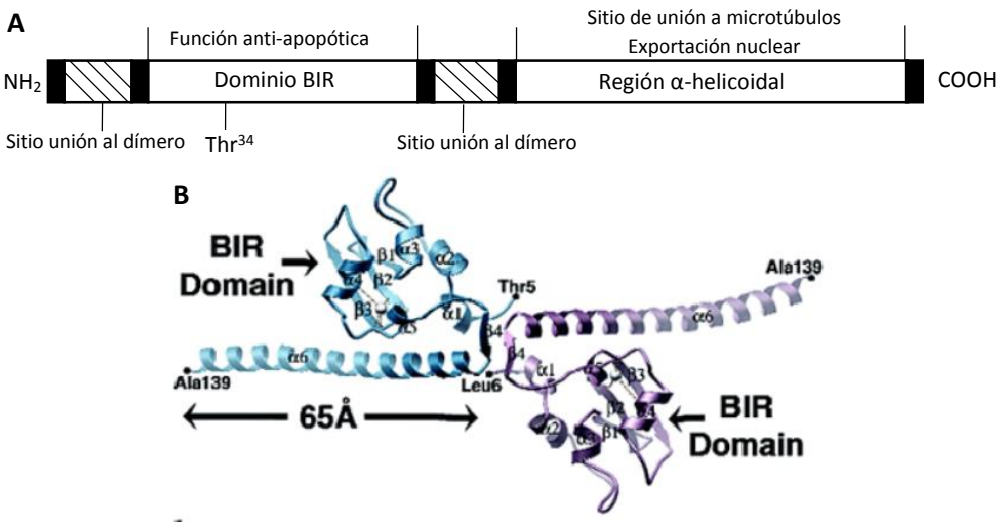

Figura 41. Estructura de la survivina. A. Monómero. B. Homodímero. Tomada de Verdecia *et al.*, 2000 con permiso de Springer Nature.

Se ha visto que el aumento en la expresión de la survivina reduce la apoptosis inducida por activadores, tanto de la vía extrínseca como intrínseca, incluyendo FasL, Bax, p53, caspasas -3, -7 , -8 y múltiples fármacos citotóxicos (Church & Talbot, 2012).

La survivina puede inhibir la muerte celular programada tanto de forma dependiente como independiente de caspasas (Fig. 42). Esta última función la lleva a cabo interfiriendo con la liberación mitocondrial del factor AIF (*apoptosis-inducing factor*). El AIF es una flavoproteína que se encuentra normalmente confinada en el espacio intermembrana mitocondrial pero que cuando se transloca al núcleo produce apoptosis por medio de la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Se ha visto que la disminución en la expresión de la survivina induce translocación del AIF en varias líneas celulares del cáncer (Athanasoula *et al*., 2014; Cheung, Cheng, Chang, Chen & Chang, 2011).

En cuanto a la apoptosis dependiente de caspasas, ésta se puede producir por medio de la interacción directa con caspasas ejecutoras e iniciadoras o por medio de la interferencia con sus inhibidores. La interacción directa de la survivina con las caspasas es todavía objeto de estudio. La proteína XIAP es capaz de inhibir las caspasas ejecutoras -3 y -7 por medio de sus dominios BIR1 y BIR2, mientras que con el dominio BIR3 es capaz de inhibir la caspasa-9. El dominio BIR de la survivina es estructuralmente similar al BIR3 de XIAP, por lo que se piensa que podría inhibir directamente la caspasa-9. Por otra parte, aunque la survivina coinmunoprecipita con las caspasas-3 y -7, no contiene los elementos estructurales típicos de otras IAPs para unirse directamente a ellas, por lo que la inhibición directa de estas caspasas necesita confirmación (Chen, Duan, Zhang & Zhang, 2016; Chiou *et al*., 2003; Johnson & Howerth, 2004).

Sin embargo, la principal forma en que la survivina ejerce su actividad anti-apoptótica es por medio de la unión a cofactores reguladores de las caspasas. La unión con XIAP aumenta la estabilidad de esta proteína y potencia su función inhibidora de caspasas. Del mismo modo, puede formar un complejo con la proteína HBIXP (*hepatitis B X-interacting protein*) para unirse a la caspasa-9, impidiendo su reclutamiento al apoptosoma. Finalmente, la survivina puede unirse a las proteínas SMAC/DIABLO, impidiendo su liberación al citosol y su función inhibidora de proteínas IAP (Athanasoula *et al*., 2014; Church & Talbot, 2012).

Por otra parte, la survivina es capaz de inhibir la muerte celular programada a través de la vía p53, impidiendo la escisión y degradación de la proteína MDM2 (Fig. 42). El MDM2 funciona como inhibidor del p53, disminuyendo sus niveles: dada su función como ubiquitín-ligasa, aumenta la degradación del supresor tumoral p53 por el proteasoma e impide la apoptosis (Boidot, Végran & Lizard-Nacol, 2014; Chen *et al*., 2016; Jaiswal, Goel, Mandhani & Mittal, 2012; Sah, Khan, Khan & Bisen, 2006).

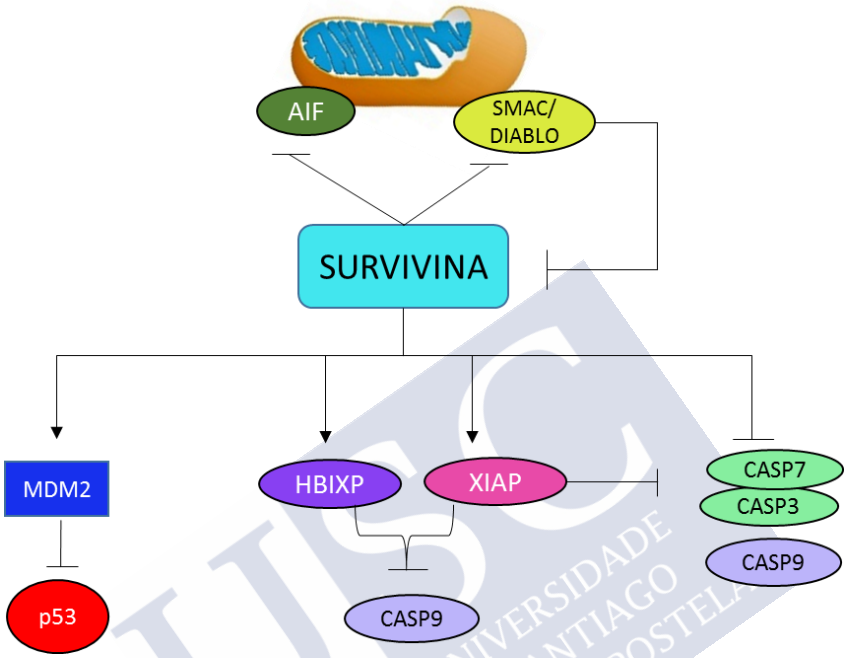

Figura 42. Distintas formas en las que la survivina ejerce su función anti-apopótica.

Curiosamente, el p53 también puede regular la survivina a nivel transcripcional, disminuyendo su expresión (Fig. 43). Este factor de transcripción suele actuar en conjunto con otros elementos como el Sin3 e histonas desacetilasas (HDACs), los cuales se unen al promotor génico de la survivina y reprimen su expresión. El p53 también puede activar y actuar sinérgicamente con metilasas como la DNMT1 (*DNA cytosine-5-methyltransferase 1*), encargadas de metilar el promotor de la survivina en islas CpG, impidiendo su expresión génica. Finalmente, el p53 puede bloquear la expresión de la survivina de forma indirecta, induciendo la expresión de p21. El p21 inhibe la cdc2/CDK1, encargada de fosforilar la proteína retinoblastoma. La acumulación de formas hipofosforiladas de retinoblastoma se unen con el factor E2F, impidiendo que éste active la expresión de genes dependientes del ciclo celular como la survivina (Boidot *et al*., 2014; Chen *et al*., 2016; Jaiswal *et al*., 2012; Sah *et al*., 2006).

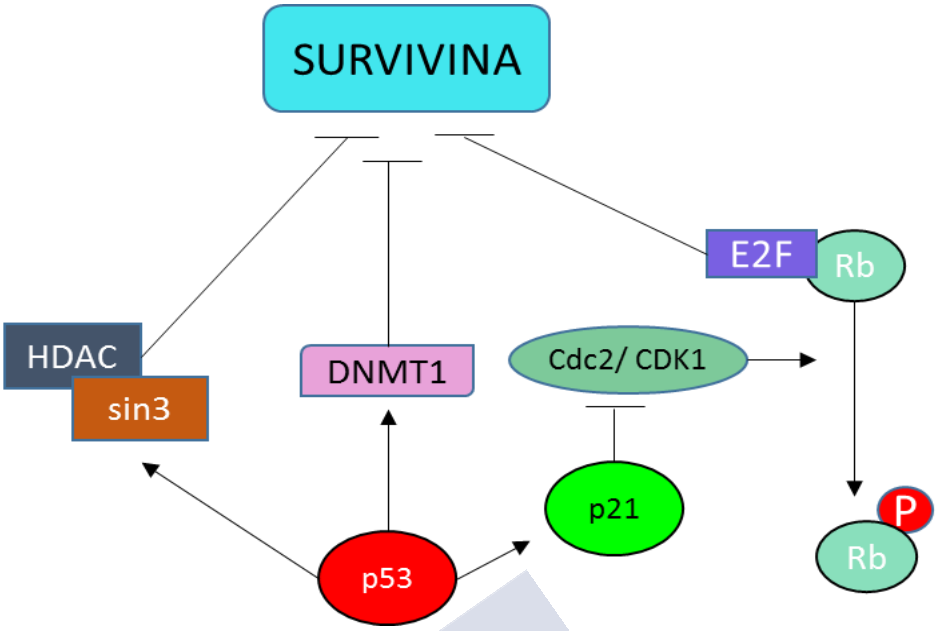

Figura 43. Regulación de la survivina por parte del supresor tumoral p53.

Además de su papel anti-apoptótico o pro-supervivencia, la survivina también favorece la proliferación celular. Se expresa fuertemente en la fase G_2/M del ciclo celular, desempeñando funciones en todas las fases de la mitosis o división. La survivina forma parte del complejo de proteínas de paso cromosómico (CPC), junto con la Aurora Kinasa B, la borealina y la proteína centromérica interna (INCENP), las cuales aseguran una perfecta unión de los cinetocoros al huso mitótico para garantizar la correcta separación de los cromosomas. Participa también en la propia formación del huso mitótico interaccionando con la tubulina, manteniendo su estructura bipolar y evitando la catástrofe mitótica. La pérdida de la survivina se ha asociado con varios defectos en el ciclo celular, como centrosomas supernumerarios, poliploidía o formación de husos multipolares y mal alineados (Altieri, 2015; Athanasoula *et al*., 2014; Johnson & Howerth, 2004).

La regulación de la survivina se produce tanto a nivel transcripcional como postraduccional. A nivel transcripcional la expresión de la survivina es dependiente del ciclo celular, aumentando durante la fase G_2/M y disminuyendo durante la fase G_1. Otros mecanismos de regulación transcripcional incluyen modificaciones epigenéticas en islas CpG presentes en su promotor o la unión de supresores tumorales como PTEN (Altieri, 2003; Altieri, 2015; Chen *et al*., 2016; Johnson & Howerth, 2004).

A nivel postraducional, la survivina tiene una vida media de 30 minutos, siendo poliubiquitinada y degradada por el proteasoma. La fosforilación en el residuo Thr^{34} por la proteína cdc2/CDK1 estabiliza la survivina durante la metafase, evitando su degradación. Esta fosforilación ocurre en el dominio BIR y resulta fundamental para la interacción con otras proteínas, especialmente la caspasa-9. La survivina puede ser fosforilada en distintos aminácidos por parte de otras kinasas mitóticas que regulan la estabilidad de la proteína y la asociación con otras proteínas clave para su funcionamiento en la mitosis y la inhibición apoptótica. Otras modificaciones postraducionales se refieren a acetilaciones en varios residuos de lisina en la región α-helicoidal, de modo que los ciclos de acetilación/desacetilación regulan

el transporte de la proteína del citoplasma al núcleo y viceversa (Altieri, 2003; Altieri, 2015; Chen *et al*., 2016; Johnson & Howerth, 2004).

- ***Contexto genómico.***

La proteína survivina está codificada por el gen *BIRC5* (*baculoviral IAP repeat containing 5*), situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25.3), en posición telomérica. La ubicación exacta se detalla en la Figura 44.

El gen *BIRC5* está formado por un total de 4 exones y 3 intrones. Por medio de *splicing* alternativo, éste puede codificar para 5 ARNm diferentes. Además de la survivina nativa de longitud completa, se encuentran otras cinco isoformas: ΔEx3, 2B, 3B, 2α y 3α. La survivina nativa presenta funciones anti-apoptóticas, pero alguna de sus isoformas son pro-apoptóticas. Aunque todas las variantes de *splicing* se encuentran en niveles más elevados en células tumorales que normales, su patrón de expresión, su localización subcelular o sus funciones todavía son objeto de estudio (Athanasoula *et al*., 2014; Jang *et al*., 2008; Johnson & Howerth, 2004; Li & Altieri, 1999; Sherry *et al*., 200; Xu, Fang, Ludewig, Iones & Jones, 2004).

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio de dos polimorfismos de la survivina: rs9904341 y rs8073069.

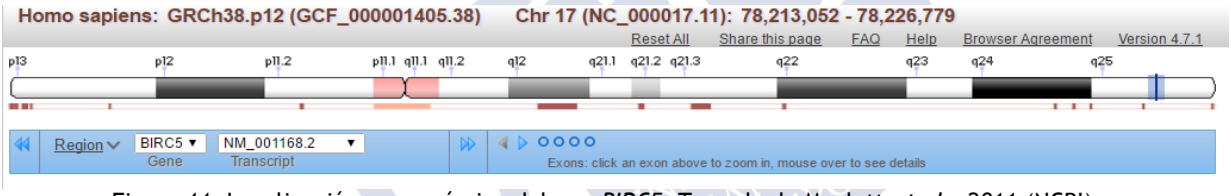

Figura 44. Localización cromosómica del gen *BIRC5*. Tomada de Maglott *et al*., 2011 (NCBI).

<u>rs9904341 (*BIRC5*)</u>

El marcador rs9904341 aparece situado en la región promotora o 5´UTR del gen *BIRC5*, en posición -31bp desde el primer nucleótido del codón de inicio ATG. Supone un cambio de la variante ancestral G por C (FWD) y se conoce como polimorfismo -31G>C. En esta posición del promotor se encuentran los elementos CDE/CHR (*cell-cycle dependent element/cell-cycle genes homology region*), los cuales se encargan de la regulación transcripcional de la proteína, aumentando su expresión durante la fase G_2/M (Sherry *et al*., 2001).

Varios estudios demuestran que este polimorfismo podría modificar la afinidad de unión de las proteínas represoras por los CDE/CHR, cambiando la actividad del promotor, afectando a la actividad transcripcional dependiente del ciclo celular y, como consecuencia, resultando en diferentes niveles de expresión del ARNm y de la propia proteína survivina (Bayram, Akkiz, Bekar & Akgöllü, 2011; Javid, Mir, Julka, Ray & Saxena, 2015; Xu *et al.*, 2004). Se ha descrito un aumento en la expresión de la survivina para los individuos portadores del genotipo homocigoto CC (Gazouli *et al*., 2009; Jang *et al*., 2008; Javid *et al*., 2015; Kawata *et al*., 2011; Li *et al*., 2013).

Se ha visto, además, que la transversión de la variante ancestral G a C se encuentra dentro de una isla CpG, por lo que podría afectar al patrón de metilación del promotor. Esto también

podría afectar a la regulación transcripcional y, por lo tanto, a la expresión génica de la survivina (Karimian *et al*., 2018).

Este SNP presenta un elevado grado de polimorfismo a nivel global, con una frecuencia del alelo menor C de 0,39. No obstante, muestra variaciones en distintas poblaciones mundiales y, en algunas de ellas, el alelo C pasa a ser el más frecuente. Este es el caso de poblaciones del Este Asiático, con una frecuencia media del 53%. Poblaciones del Sur de Asia y africanas presentan una distribución alélica similar, con frecuencias en torno al 35%, mientras que en las europeas la frecuencia del alelo C oscila entre 0,28 y 0,40 (Fig. 45) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

rs8073069 (*BIRC5*)

El rs8073069 (-625G>C) también se encuentra situado en la región promotora del gen *BIRC5*, concretamente 625pb antes del codón de inicio ATG e involucra a la transición de la variante ancestral G por C en FWD (Sherry *et al*., 2001). Aunque su implicación funcional se desconoce, la variante alélica C de este polimorfismo se ha asociado con un incremento en la expresión de la survivina en tejidos cancerígenos (Yang *et al*., 2009).

La frecuencia media del alelo menor C del rs8073069 a nivel mundial es 0,34. Poblaciones del Este de Asia son las que tienen un menor grado de polimorfismo a nivel global (0,22). En regiones del Sur Asiático la frecuencia de este alelo es superior (0,30), presentando homogeneidad entre poblaciones. Por otra parte, en población europea, la frecuencia del alelo C oscila entre 0,25 y 0,32. La distribución alélica de este SNP destaca especialmente en el continente africano, con una frecuencia media idéntica entre ambos alelos (0,50) (Fig. 45) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

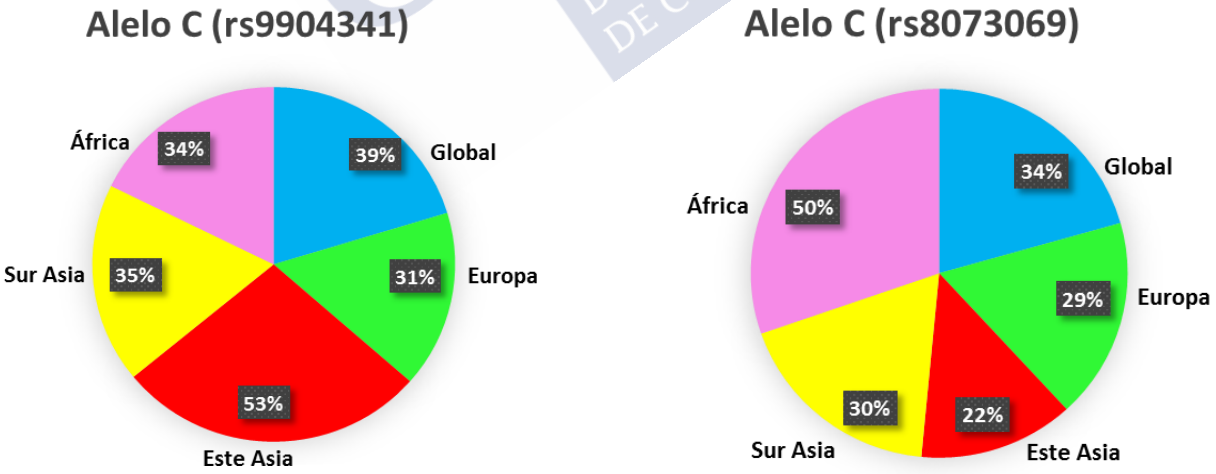

Figura 45. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs9904341 (*BIRC5*) y rs8073069 (*BIRC5*) según la frecuencia del alelo menor C. Basadas en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

Aunque la survivina es prácticamente indetectable en órganos normales diferenciados, aparece ampliamente expresada en la mayoría de lesiones preneoplásicas y cánceres humanos, incluyendo colon, mama, pulmón, páncreas, próstata, estómago, esófago, hígado, vejiga, ovario o linfoma. La sobreexpresión de esta proteína se ha asociado con un tumor más agresivo, una resistencia a la terapia, mayor riesgo de recurrencia y una supervivencia general más corta. La expresión específica de la survivina en células cancerígenas la diferencian del resto de IAPs, que aparecen expresadas bajo condiciones normales y exhiben solo un modesto incremento en las células malignas. Esta expresión diferencial en lesiones preneoplásica y tejidos tumorales la convierten en un marcador potencial del cáncer y una diana para desarrollar posibles estrategias terapéuticas (Athanasoula *et al*., 2014; Boidot *et al*., 2014; Chiou *et al*., 2003; Church & Talbot, 2012; Jaiswal *et al*., 2012; Sah *et al*., 2006; Waligórska-Stachura *et al*., 2012; Yamamoto, Ngan & Monden, 2008).

Además de aumentar la supervivencia tumoral por medio de la inhibición de la apoptosis, la survivina está implicada en la angiogénesis, al favorecer la formación de nuevos vasos sanguíneos y la síntesis de estructuras vasculares intratumorales. Por otra parte, la survivina también se ha caracterizado como un gen metastásico, ya que se ha encontrado proteína extracelularmente, pudiendo afectar al microambiente tumoral. Esto se debe a que el complejo que forma con XIAP puede potenciar la activación del factor NF-kB, el cual permite la expresión de genes que median la invasión celular y la migración, favoreciendo la movilidad y el potencial metastásico de las células tumorales (Athanasoula *et al*., 2014; Boidot *et al*., 2014; Chiou *et al*., 2003; Church & Talbot, 2012; Jaiswal *et al*., 2012; Sah *et al*., 2006; Waligórska-Stachura *et al*., 2012; Yamamoto *et al*., 2008).

La sobreexpresión de la survivina está involucrada en la resistencia a la terapia anti-andrógenos en células humanas prostáticas debido a la inhibición de la apoptosis (Cheung *et al*., 2011). Aunque en la mayoría de estudios no se ha descrito una expresión de la survivina en células prostáticas normales, sí se ha encontrado una fuerte expresión de esta proteína en líneas celulares de PCa (Chen *et al*., 2013). Un estudio (Shariat *et al*., 2004) ha encontrado que los niveles de expresión de la survivina parecen incrementarse gradualmente desde un carcinoma primario (71%) hasta una metástasis de nódulos linfaticos (88%). La expresión anormal de la survivina se ha asociado, además, con una puntuación de *Gleason* más elevada (el 86% de los pacientes con *Gleason* $\geq$7 exhibieron expresión de la survivina) y con un incremento en el riesgo de experimentar progresión bioquímica después de la cirugía. Los pacientes con carcinoma de próstata de características agresivas expresaron niveles de survivina mucho más elevados que aquellos cuya progresión no es agresiva (100% vs. 85%) (Shariat *et al*., 2004). El papel de la survivina en la progresión carcinogénica y la asociación con un carcinoma de próstata agresivo se confirma al obtener una expresión superior en líneas celulares andrógeno-independientes (DU145, PC3) que en andrógeno sensibles (LNCap) (McEleny, Watson, Coffey, O´Neill & Fitzpatrick, 2002).

rs9904341 (*BIRC5*)

Se han publicado dos estudios relacionando el rs9904341 con el carcinoma prostático, uno en población china (Chen *et al*., 2013) y otro en población iraní (Karimian *et al*., 2018). En el primero se ha desvelado un aumento en la susceptibilidad para los individuos portadores de los genotipos CG o CC en comparación con los homocigotos GG, efecto que se acentúa en los

individuos no consumidores de alcohol o tabaco y sin una historia familiar de cáncer. Se obtiene la misma tendencia en población iraní, aunque el riesgo de los varones con el genotipo CC es notablemente superior que el de aquellos con el CG. En cuanto a la interacción de este polimorfismo con diversos factores ambientales, se ha descrito un incremento en el riesgo de desarrollar este carcinoma para los individuos menores o iguales de 69 años y, a diferencia de lo encontrado en el estudio anterior, para aquellos fumadores. En nuestro estudio se aborda por primera vez el impacto del polimorfismo sobre el cáncer de próstata en población europea.

Jang y colaboradores (2008), fueron los primeros en investigar la relación del polimorfismo rs9904341 con la susceptibilidad al cáncer. En el estudio se describía una disminución significativa en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón para aquellos individuos que presentaban al menos una copia del alelo G (CG+GG), en comparación con los individuos CC. Estos investigadores demostraron, además, que en comparación con el alelo C, la variante alélica G se asociaba con una actividad del promotor más baja. De acuerdo con estos hallazgos, otros autores han encontrado un aumento en los niveles de ARNm y de proteína survivina para los individuos CC, en comparación con aquellos CG o GG, por lo que este genotipo se asociaba con una sobreexpresión de la proteína a nivel transcripcional (Gazouli *et al*., 2009; Jang *et al*., 2008; Javid *et al*., 2015; Kawata *et al*., 2011; Li *et al*., 2013). También se ha encontrado un aumento en la expresión de la survivina en personas consumidoras de tabaco en comparación con aquellas no fumadoras (Javid *et al*., 2015).

Además de en carcinoma de pulmón (Aynaci *et al*., 2013; Guo *et al*., 2015; Javid *et al*., 2015), el efecto diferencial de los genotipos del polimorfismo rs9904341 se ha valorado en otros tipos de cáncer, como el de vejiga (Jaiswal *et al*., 2012; Kawata *et al*., 2011), el colorrectal (Gazouli *et al*., 2009; Li *et al*., 2013; Yamak *et al*., 2014), el hepatocelular (Bayram *et al*., 2011; El-Said *et al*., 2016; Hsieh *et al*., 2012; Li, Wang, Jiang, Lin & Meng, 2012), el urotelial (Lin *et al*., 2017; Wang *et al*., 2009), el renal (Marques *et al*., 2013; Qin *et al*., 2012), el nefroblastoma (Radojevic-Skodric *et al*., 2012), el pancreático (Qin & Yu, 2015; Theodoropoulos, Michalopoulos, Panoussopoulos, Taka & Gazouli, 2010), el gástrico (Liarmakopoulos *et al*., 2013; Yang *et al*., 2009), el de mama (Altiparmark *et al*., 2014; Rasool *et al*., 2018), el de endometrio (Aminimoghaddam *et al*., 2015; Zahedi *et al*., 2012), el de ovario (Velapasamy *et al*., 2013) o el de cabeza y cuello (Andric *et al*., 2012; Kostić *et al*., 2013; Ma *et al*., 2011; Upadhyay , Khurana, Kumar, Ghoshal & Mittal, 2011; Weng *et al*., 2012; Yang *et al*., 2009; Yazdani *et al*., 2012). La mayoría de los estudios que encuentran asociación con la carcinogénesis, desvelan un aumento en el riesgo para los individuos portadores del genotipo homocigoto CC.

rs8073069 (*BIRC5*)

Con respecto al polimorfismo rs8073069, se ha encontrado un aumento en la susceptibilidad al cáncer de esófago para los individuos con el genotipo CC o el alelo C. Estos autores (Yang *et al*., 2009), encontraron una mayor frecuencia del alelo C en tejidos cancerígenos que presentaban expresión de la survivina, mientras que en aquellos con expresión negativa existía una mayor abundancia del genotipo GG. Por otra parte, otros estudios no han encontrado un impacto diferencial de los genotipos de este polimorfismo en el inicio del cáncer de esófago (Wang *et al*., 2019), de colon (Yamak *et al*., 2014), de pulmón (Guo *et al*., 2015; Jang *et al*., 2008) o hepatocelular (Li *et al*., 2012).

Varios autores han descrito una asociación entre los haplotipos formados por polimorfismos situados en el gen *BIRC5* y el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Guo *et al*., 2015; Jang *et al*., 2008; Li *et al*., 2012; Yang *et al*., 2009).

No se ha publicado ningún estudio, hasta el momento, vinculando el rs8073069 de la survivina con la susceptibilidad a padecer cáncer de próstata, por lo que el trabajo llevado a cabo en población de Galicia resultará fundamental para aportar conocimiento acerca de la influencia de este marcador en la etiogénesis del PCa.

1.4.5. p53 Y MDM2.

- ***Estructura molecular y función biológica.***

El p53 es un supresor tumoral que evita la proliferación incontrolada de células ante situaciones de estrés celular diversas, tales como el daño genotóxico, la hipoxia, la activación oncogénica, el estrés oxidativo o la hipoglucemia. Esta función la desempeña al actuar como un factor de transcripción que activa la expresión de una serie de genes implicados en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia celular o la apoptosis (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry, 1999; Levine & Oren, 2009).

La proteína p53 fue identificada en 1979 gracias a su acumulación en el núcleo de las células transformadas por el virus tumoral SV40. Dada su elevada expresión en este tipo celular y en otras células cancerígenas, el gen que codifica la proteína p53 se identificó inicialmente como un oncogén. No obstante, años más tarde, se descubrió que las propiedades oncogénicas del *TP53* se debían a la presencia de formas mutadas que causaban la pérdida de su funcionalidad, por lo que su verdadera función en la célula era la de actuar como un potente supresor tumoral. Estos hallazgos fueron posibles gracias al estudio con ratones *knockout tp53*-/-, esto es, ratones modificados por ingeniería genética en los que ha sido inactivado el gen *tp53*. Los resultados desvelaron que estos ratones eran propensos a desarrollar tumores espontáneos: el 75% de ellos sufrieron cáncer a los seis meses de vida y el 100% murieron a causa de ellos cuando alcanzaron los diez (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry, 1999; Levine & Oren, 2009).

El p53 es una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos altamente conservada en distintas especies y con un peso molecular inicialmente estimado en 53 kDa, motivo por el cual recibe esta denominación (Levine & Oren, 2009; Sivoňová *et al*., 2015).

Estructuralmente, la proteína p53 aparece constiuida por tres dominios funcionales: un dominio N-terminal, un dominio central y un dominio C-terminal (Fig. 46). El extremo N-terminal está formado por un dominio de transactivación (TAD, Box I), necesario para su interacción con coactivadores y correpresores transcripcionales y sujeto a fosforilaciones que estabilizan la proteína (ATM, ATR…) así como una región rica en prolina con múltiples copias de la secuencia PXXP (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry; 1999; Saha, Kar & Sa, 2015).

El dominio central contiene la región de unión al ADN, la cual se une específicamente a secuencias en los genes dianas conocidas como elementos de respuesta al p53 (p53 RE). Esta zona es un punto caliente de mutaciones *missense*, de modo que los aminoácidos de esta región aparecen frecuentemente mutados en los tumores humanos (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry; 1999; Saha *et al*., 2015).

Finalmente, el dominio C-terminal contiene la región de tetramerización, para dar lugar a la forma funcional de la proteína, y una región regulatoria sujeta a modificaciones postraduccionales, tales como fosforilaciones y acetilaciones, las cuales también estabilizan la proteína al impedir que los residuos de lisina sean ubiquitinados. La proteína p53 contiene, además, una secuencia de localización nuclear (NLS) y una secuencia de exportación nuclear (NES) (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry; 1999; Saha *et al*., 2015).

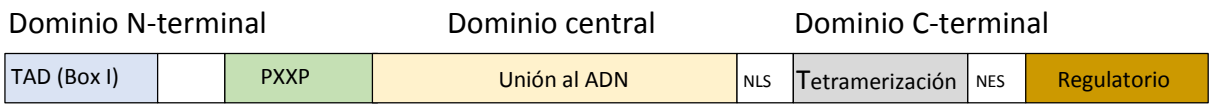

Figura 46. Estructura del factor de transcripción p53.

En condiciones normales con ausencia de estrés, la vida media de la proteína p53 es muy corta (20-30 minutos), por lo que su presencia en la célula es prácticamente indetectable. Los niveles de p53 en una célula no estresada se mantienen bajos principalmente gracias a la función inhibitoria que la proteína MDM2 (*murine double minute 2*) ejerce sobre ella. El *MDM2* fue identificado como uno de los tres genes (*mdm1, mdm2, mdm3*) que aparecen sobreexpresados más de 50 veces por amplificación en una línea celular de ratones transformada espontáneamente (3T3-DM). Más tarde se comprobó que el producto del gen *mdm2* era el responsable de la transformación cancerígena, identificándose como un oncogén (Burns & El-Deiry, 1999). La función del MDM2 como un regulador negativo del p53 fue demostrada gracias al estudio con ratones *knockout*: aquellos con el fenotipo *mdm2*$^{-/-}$ sufrían muerte embrionaria prematura, mientras que en aquellos *mdm2*$^{-/-}$ *p53*$^{-/-}$ se reestablecía el fenotipo normal (Burns & El-Deiry, 1999).

La proteína MDM2 ejerce su función reguladora sobre el p53 controlando su estabilidad, localización celular y transactivación. Puede inhibir la actividad del p53 en su forma no fosforilada uniéndose a su dominio de transactivación (TAD, Box I) en el extremo N-terminal, impidiendo su interacción con la maquinaria transcripcional basal y coactivadores transcripcionales como p300/CBP. El bloqueo del dominio TAD impide que el p53 pueda activar la transcripción de genes diana. El MDM2 funciona, además, como una ubiquitín ligasa E3, por lo que puede mediar la ubiquitinación del p53 en el extremo C-terminal. El proceso de ubiquitinación consiste en la adicción de la proteína ubiquitina con el objetivo de marcar las proteínas que ya no son necesarias para su destrucción en el proteasoma. De este modo, la forma ubiquitinada del p53 puede ser exportada al citoplasma y degradada por el proteasoma 26S. La proteína MDM2 puede reclutar, además, histonas desacetilasas (HDAC1) que eliminan grupos acetilo en el extremo C-terminal. Esto convierte al p53 en una molécula más accesible para la ubiquitinación, dado que existe competencia por la acetilación y ubiquitinación de los mismos residuos de lisina (Amaral, Xavier, Steer & Rodrigues, 2010; Bai & Zhu; 2006; Iwakuma & Lozano, 2003; Levine & Oren, 2009; Toledo & Wahl, 2007).

Curiosamente, el propio MDM2 posee elementos de respuesta al p53 en el promotor P2, por lo que también es diana transcripcional del p53. Por consiguiente, estas proteínas actúan en un bucle de retroalimentación negativo en donde el p53 induce la expresión de su propio inhibidor MDM2 y éste, a su vez, dirige la ubiquitinación de sí mismo y del p53 para que ambos sean degradados por el proteasoma. Este sistema permite mantener los niveles de p53 bajos cuando una célula no se encuentra en situación de estrés, evitando una respuesta apoptótica

excesiva (Amaral *et al*., 2010; Bai & Zhu; 2006; Iwakuma & Lozano, 2003; Levine & Oren, 2009; Toledo & Wahl, 2007).

Se ha descubierto otro inhibidor del p53 altamente homólogo al MDM2: el MDM4 o MDMX. No obstante, sus papeles no son redundantes, ya que niveles normales de uno de ellos no permite compensar la pérdida del otro. El MDM4 puede unirse y bloquear el dominio TAD (Box I) del p53, pero no es diana transcripcional del mismo ni presenta actividad ubiquitín ligasa E3 (Levine & Oren, 2009; Toledo & Wahl, 2007).

A nivel estructural, el MDM2 es una proteína de 491 aminoácidos formada por tres dominios bien conservados: un dominio N-terminal, un dominio en dedos de zinc, una región acídica y un dominio C-terminal (Fig. 47). El dominio N-terminal es la región que se une al dominio de transactivación del p53 (Box I), por lo que se conoce como BoxI BD (*box I binding domain*). Un total de 13 residuos en este dominio son fundamentales para la unión con p53, 10 de los cuales aparecen conservados en MDM4. El dominio C-terminal RING es necesario para la formación de homodímeros entre los monómeros de MDM2 o bien heterodímeros con MDM4, los cuales parecen ser la conformación más activa. El dominio RING del MDM2 es responsable, además, de su actividad ubiquitín ligasa E3. La funcionalidad del dominio en dedos de zinc y de la región acídica de esta proteína está por dilucidar, aunque se sabe que esta última región también se une al p53 y puede ser fosforilada en respuesta a un daño en el ADN, regulando la estabilidad del MDM2. Para su translocación núcleo-citoplasma o nucléolo-citoplasma contiene una secuencia de localización nuclear (NLS), otra de localización nucleolar (NoLS) y una de exportación nuclear (NES) (Iwakuma & Lozano, 2003; Meek, 2009; Toledo & Wahl, 2007).

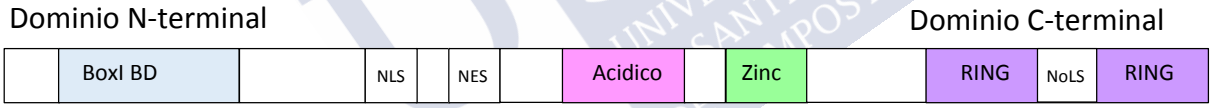

Figura 47. Estructura del regulador negativo MDM2.

Cuando la célula se encuentra sometida a una serie de factores estresantes como daño en el ADN, hipoxia, activación oncogénica, estrés oxidativo (ROS, RNS) o falta de glucosa, el p53 se estabiliza y aumentan sus niveles en el núcleo. La estabilización del p53 se debe principalmente a modificaciones postraduccionales como la fosforilación en el extremo N-terminal así como la fosforilación, la acetilación y la sumoilación en el extremo C-terminal. Estos procesos impiden la inhibición y ubiquitinación del p53 mediada por el MDM2, evitando que sea degradado en el proteasoma (Burns & El-Deiry, 1999; Meek, 2009).

La fosforilación del p53 se lleva a cabo gracias a la acción de una serie de kinasas celulares, entre las que destacan Chk1 (*chekpoint kinase 1*) y Chk2 (*chekpoint kinase 2*), activadas por las proteínas ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*) y ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) en respuesta a diversas formas de daño en el ADN. La proteína ATM juega un papel fundamental en la detección inmediata de roturas de doble cadena del ADN, mientras que la ATR responde ante otras lesiones como roturas de cadena sencilla o estrés en la replicación. Otras situaciones favorecen la estabilización del p53 por medio de la activación del factor HIF1-α (hipoxia) o del p19ARF (activación oncogénica) (Fig. 48) (Burns & El-Deiry, 1999; Meek, 2009).

Una vez que el p53 permanece estable en la célula es responsable de activar genes implicados en funciones como la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia celular, la inhibición de la angiogénesis o la inducción de la apoptosis (Fig. 48). Estas respuestas favorecen la reparación y la supervivencia de las células dañadas o la eliminación de aquellas con un daño excesivo. Estas acciones permiten garantizar la integridad celular, impidiendo así una proliferación incontrolada de células con daño genotóxico que podrían conducir a la transformación neoplásica. Por este motivo, el p53 recibe el nombre de "supresor tumoral" o "guardián del genoma". La decisión entre la detención del ciclo celular o la apoptosis parece depender de varios factores como el tipo de célula, el microambiente celular, el estímulo estresor, el grado de daño genotóxico o los propios niveles de p53 en la célula (Amaral *et al*., 2010; Burns & El-Deiry, 1999; Haupt, Berger, Goldberg & Haupt, 2003; Hofseth, Hussain & Harris, 2004; Zörnig, Hueber, Baum & Evan, 2001).

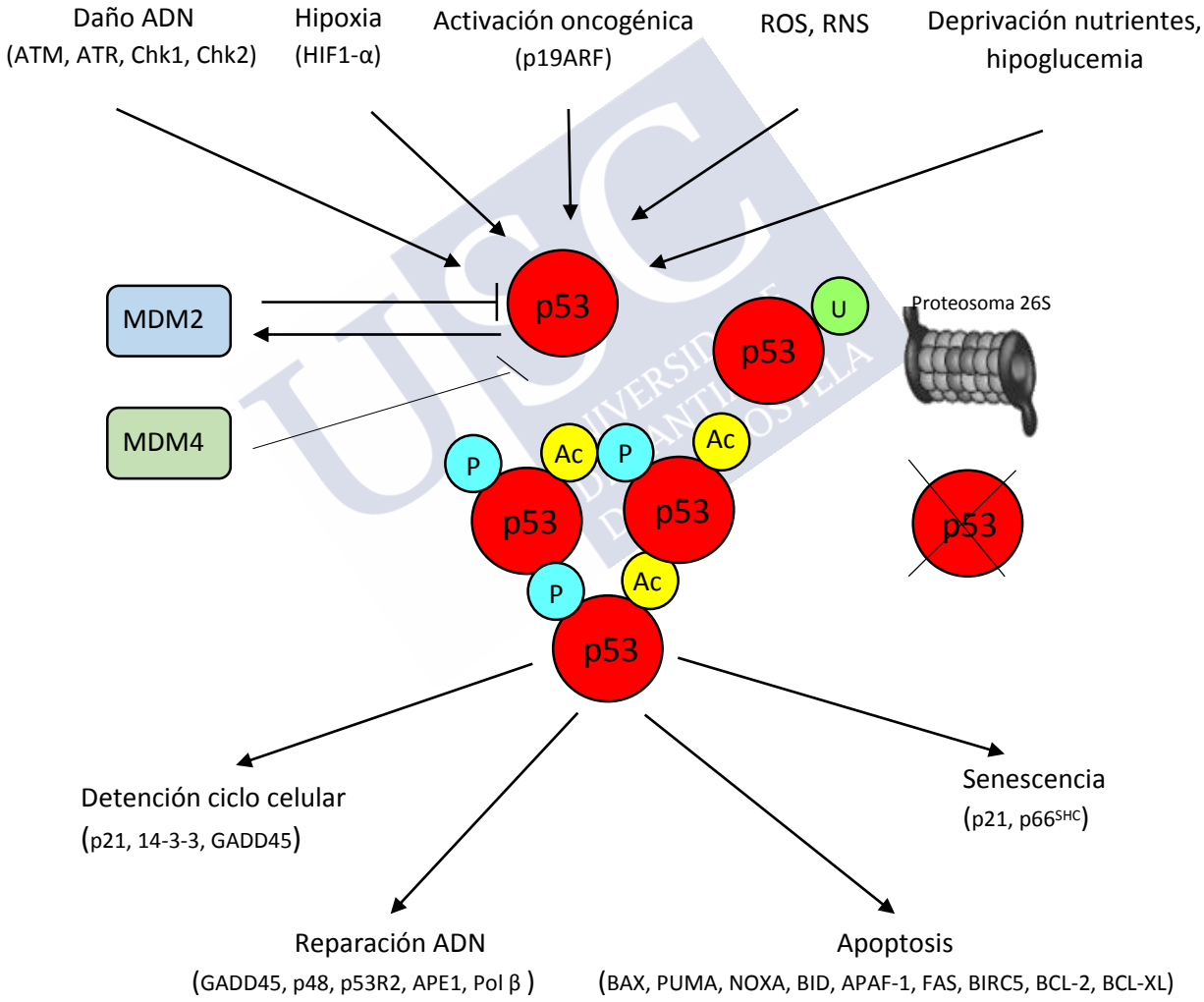

Figura 48. Factores estresantes y respuestas celulares del p53.

El p53 promueve la apoptosis cuando el daño al ADN es tan severo que no puede ser reparado. Induce la muerte celular programada actuando como un factor de transcripción, pero también por medios independientes de la síntesis proteica (Fig. 49). En el núcleo de la célula, el p53 transactiva una serie de genes por medio de la interacción de su dominio TAD con la maquinaria transcripcional. Estos genes presentan dominios de unión al p53 en sus regiones promotoras o intrónicas, afectando a su expresión (Amaral *et al*., 2010; Chi, 2014; Haupt *et al*., 2003).

El primer gen apoptótico con elementos de respuesta al p53 en ser descubierto fue el *BAX*. No obstante, el p53 permite la expresión génica de otros miembros de la familia Bcl-2, tales como *PUMA* (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), *NOXA* o *BID*. La proteína Puma activa de forma indirecta a Bax, liberándolo de su inhibidor Bcl-2. Noxa se activa en respuesta a la irradiación con rayos X y parece desarrollar un papel similar al de Puma. Otros genes de la ruta mitocondrial que se expresan en respuesta al p53 son *APAF-1* o *p53AIP1* (*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*). Con respecto de la vía extrínseca, el p53 también transactiva genes codificadores de receptores de membrana como *FAS* o *DR5*. Además de la transactivación, el p53 puede llevar a cabo la transrepresión de genes pro-supervivencia como el *BIRC5*, el *BCL2* o el *BCL-XL* (Amaral *et al*., 2010; Chi, 2014; Haupt *et al*., 2003).

Por otra parte, el p53 media la función apoptótica sin necesidad de síntesis de ARNm o proteína *de novo* (Fig. 49). Cuando se produce un estímulo apoptótico, el p53 puede translocarse a la mitocondria e interaccionar físicamente con los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-xl, permitiendo la liberación de Bax de sus inhibidores. De este modo, Bax, que también puede ser activado directamente por el p53, forma poros en la membrana mitocondrial para promover la liberación del citocromo *c* y desencadenar la muerte celular programada. También se ha visto que una fracción del p53 puede liberar el citocromo *c* directamente formando un complejo con la proteína del MPTPC ciclofilina D. Con respecto a la vía extrínseca, el p53 favorece el tráfico de receptores Fas desde el aparato de *Golgi* hasta la membrana celular, sensibilizando las células a la apoptosis (Amaral *et al*., 2010; Chi, 2014; Haupt *et al*., 2003).

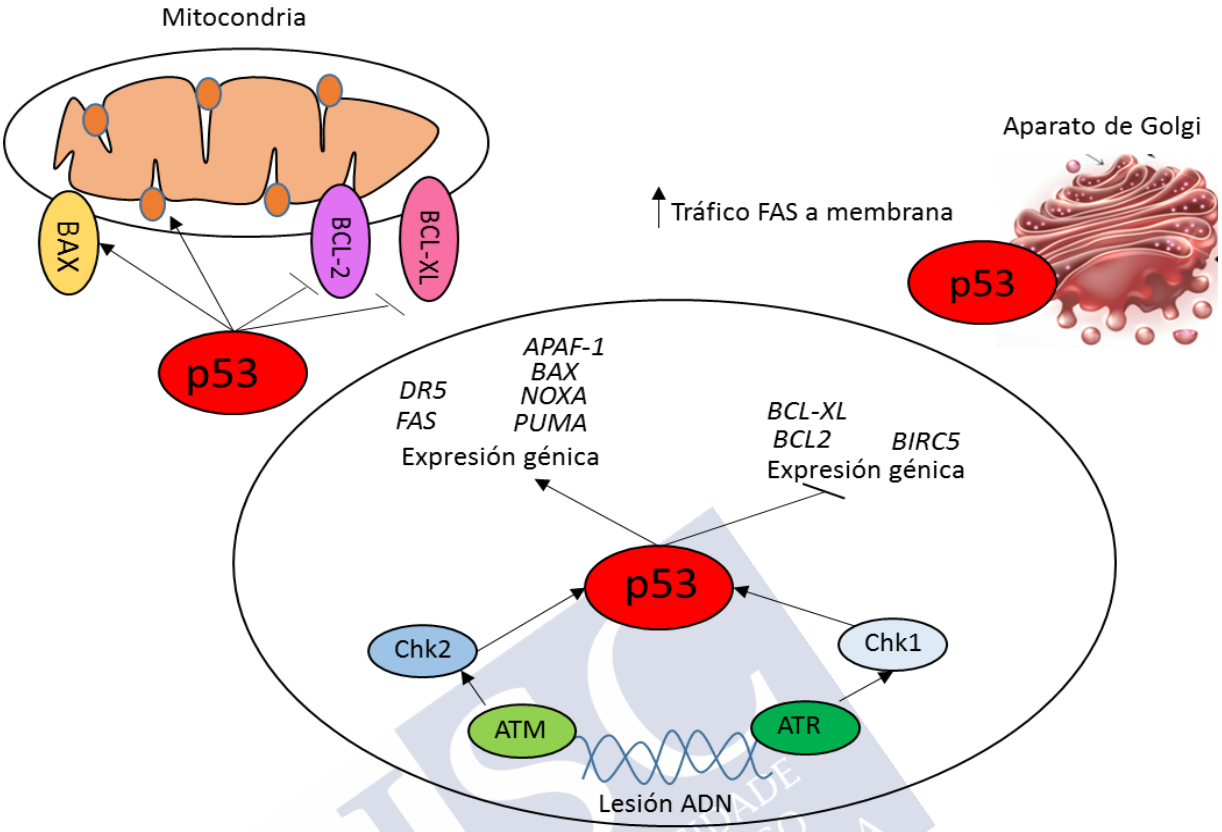

Figura 49. Efectos del supresor tumoral p53 en la apoptosis.

- ***Contexto genómico.***

TP53

La proteína p53 está codificada por el gen *TP53* (*tumor protein* 53), el cual aparece constituido por un total de 11 exones y se ubica en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) (Fig. 50). En este trabajo se ha estudiado la variabilidad alélica del rs1042522 en el *locus TP53*.

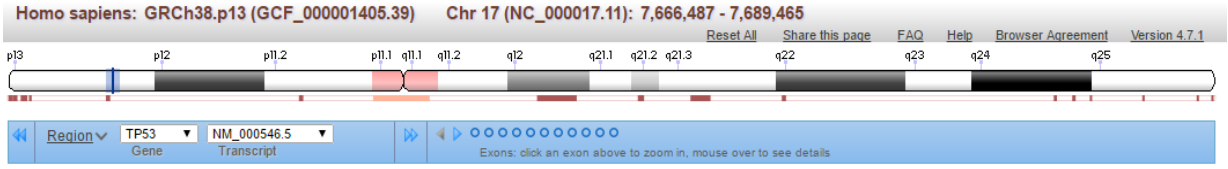

Figura 50. Localización cromosómica del gen *TP53*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

rs1042522 (*TP53*)

El gen *TP53* presenta un elevado número de polimorfismos en su secuencia, siendo el más conocido el rs1042522, el cual está ubicado en el dominio rico en prolina (PXXP), región

fundamental para que el p53 lleve a cabo la función apoptótica. Concretamente, el SNP está situado en el exón 4 del gen e implica la sustitución del alelo ancestral C por G (REV). Este cambio nucleotídico acarrea la sustitución del aminoácido prolina (P, C**C**C) por arginina (R, C**G**C) en el codón 72 de la proteína, motivo por el cual se conoce como Pro72Arg. Se trata, por lo tanto, de una variante *missense* que resulta en un cambio estructural de la proteína p53, pudiendo modificar sus propiedades bioquímicas y funcionales (Aydin *et al*., 2017; Sherry *et al*., 2001; Sivoňova *et al*., 2015; Xue *et al*., 2016).

Se ha descrito que la variante prolina presenta una mayor actividad transcripcional así como una eficiencia más elevada a la hora de llevar a cabo la detención del ciclo celular en la fase G_1 y de activar el sistema de reparación del ADN. Por otra parte, la variante arginina se ha asociado con una mayor capacidad de inducción de la apoptosis y una supresión de la transformación celular más elevada. La variante arginina se une más eficientemente a promotores de genes pro-apoptóticos, aumentando su expresión en células portadoras de esta variante. La variante arginina también incrementa la capacidad del p53 de translocarse a la mitocondria, favoreciendo la liberación del citocromo *c*. Por último, se ha visto que este polimorfismo está regulado por las proteínas estimuladoras de la apoptosis (ASPP), las cuales se unen a la región rica en prolina del p53 y favorecen su actividad apoptótica. Los inhibidores de estas proteínas (iASPP) se unen selectivamente a la variante prolina de este polimorfismo, inhibiendo la actividad de las ASPP. Sin embargo, la variante arginina escapa de la inhibición de los iASPP, contribuyendo a una capacidad apoptótica más elevada de esta isoforma (Bergamaschi *et al*., 2006; Dumont, Leu, Della Pietra, George & Murphy, 2003; Jeong, Hu, Belyi, Rabadan & Levine, 2010; Pim & Banks, 2004; Thomas *et al*., 1999).

El rs1042522 presenta un grado de polimorfismo elevado a nivel global, con una frecuencia de la variante C (Pro) del 46%. Este alelo es el mayoritario en poblaciones africanas, con una media del 67%, pero alcanza frecuencias del 75% en algunas regiones. En poblaciones del Sur de Asia su frecuencia es mucho menor, variando entre el 54% y el 42%. Grupos humanos del Este Asiático presentan una frecuencia media del 41%, mientras que los europeos cuentan con las frecuencias más bajas de este alelo, con una media del 29% (Fig. 51).

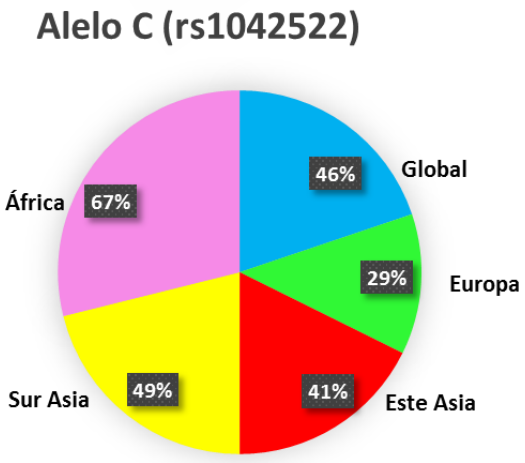

Figura 51. Variabilidad poblacional del rs1042522 (*TP53*) según la frecuencia del alelo C, correspondiente al aminoácido prolina (CCC). Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

MDM2

El gen *MDM2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q15) y cuenta con 11 exones (Fig. 52). En el *MDM2* se encuentran dos promotores funcionalmente distintos: el P1, el cual se sitúa *upstream* del P2, actuando como un promotor basal, y el P2, ubicado en el intrón 1 y que funciona como un promotor alternativo. El promotor P1 regula la expresión del gen en condiciones no estresantes, mientras que el P2 posee elementos de respuesta al p53 y controla la expresión del gen bajo condiciones de estrés celular (Maruei-Milan, Heidari & Salimi, 2019). En este estudio se han analizado dos polimorfismos del *locus MDM2*: rs2279744 y rs937283.

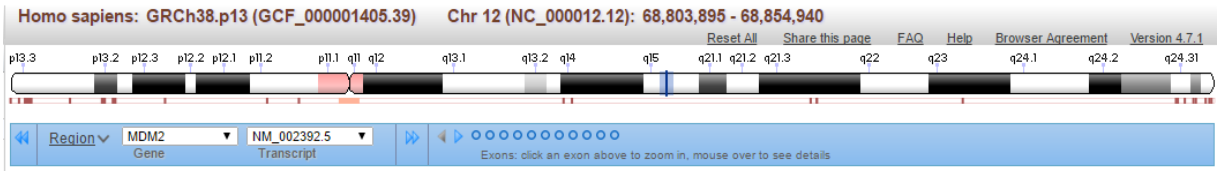

Figura 52. Localización cromosómica del gen *MDM2*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

rs2279744 (*MDM2*)

El rs2279744 (SNP309 T>G; -410T>G) se sitúa en el promotor intrónico P2 del gen *MDM2* y afecta a los niveles de expresión del mismo. El cambio de la variante T por G (FWD) crea un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1. Como resultado, los individuos homocigotos para el alelo G (GG) expresan niveles de ARNm y de proteína más elevados que aquellos homocigotos para el alelo T (TT), lo que a su vez incrementa la inhibición del p53 (Bond *et al.*, 2004; Knappskog *et al.*, 2012; Sherry *et al.*, 2001).

El rs2279744 tiene, a nivel global, un grado de polimorfismo medio, con una frecuencia del alelo G de 0,37 (Fig. 53). Se trata de una variante poco frecuente en poblaciones africanas (0,07), con frecuencias que, generalmente, no alcanzan el 10%. La frecuencia del alelo G oscila entre el 28% y el 44% en Europa. Con respecto a poblaciones asiáticas, presentan un grado de diversidad genética muy elevada con una frecuencia del alelo G próximo al 50%, aunque existe un mayor grado de homogeneidad entre las poblaciones del Sur de Asia que en las del Este Asiático.

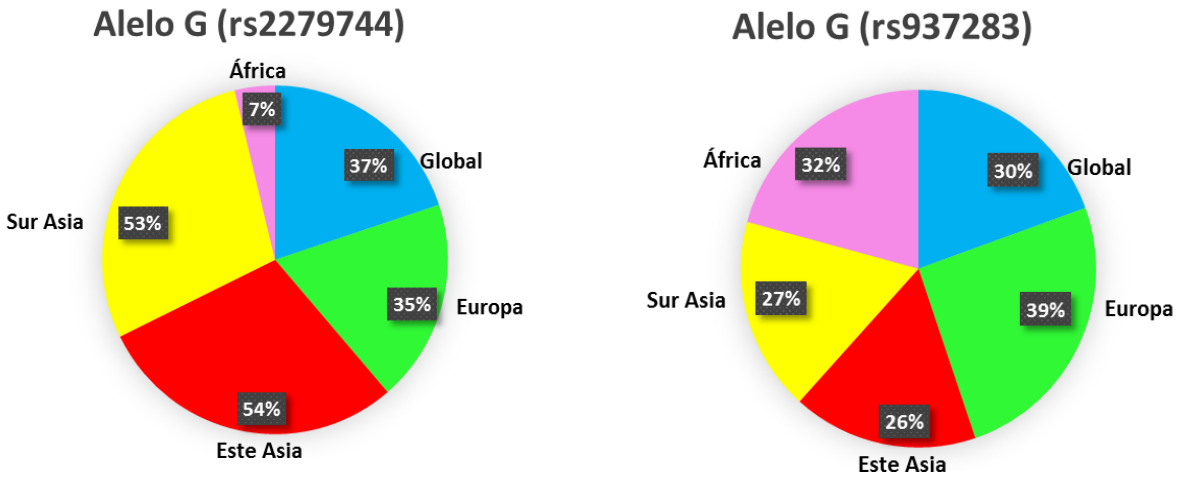

Figura 53. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs2279744 (*MDM2*) y rs937283 (*MDM2*) según la frecuencia del alelo G. Basadas en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

rs937283 (*MDM2*)

El rs937283 (A2164G) se localiza en el promotor P1 y supone el cambio de la variante ancestral A por G en el nucleótido -2164 (FWD) (Jiao *et al*., 2016, Sherry *et al*., 2001). Se ha demostrado que la variante G incrementa la actividad transcripcional del gen *MDM2*, asociándose con niveles de ARNm y proteína mayores (Jiao *et al*., 2016), lo que podría incrementar la inhibición sobre el p53. Aunque los mecanismos exactos de este aumento en la expresión génica están por dilucidar, se ha sugerido que este polimorfismo podría afectar a la afinidad de unión a diversos factores de transcripción (Jiao *et al*., 2016).

El rs937283 (Fig. 53) presenta una frecuencia del alelo menor G de 0,30 a nivel global. Las poblaciones europeas son las que tienen un mayor grado de polimorfismo (0,39), aunque existe bastante diversidad entre ellas. Tras los europeos, los grupos poblaciones africanos son los que presentan una frecuencia media de este alelo más elevada (0,32). Por otra parte, en el Sur de Asia y en el Este de Asia se encuentran valores muy similares a nivel global (0,27 y 0,26, respectivamente), si bien existen ligeras diferencias según el subgrupo poblacional.

- ***Relación con el cáncer.***

Como se ha comentado anteriormente, la importancia del gen *TP53* en el desarrollo carcinogénico se puso de manifiesto al comprobar que ratones *knockout tp53-/-*, con el gen *tp53* inactivado por medio de ingeniería genética, eran propensos a desarrollar tumores espontáneos. La función del p53 como supresor tumoral se debe a su actuación como "guardián del genoma", de modo que al detectar inestabilidad genómica o daño genotóxico promueve la detención del ciclo celular hasta que los daños son reparados o induce la apoptosis celular cuando el daño al ADN es demasiado severo. Esto protege al organismo de una proliferación celular incontrolada eliminando células dañadas que podrían conducir a un cáncer. Además de su función en los estadios tempranos del tumor, su capacidad de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos

(angiogénesis) impide la progresión del mismo hacia un estado metastásico (Bai & Zhu, 2006; Burns & El-Deiry, 1999; Levine & Oren, 2009).

De acuerdo con estas funciones, el *TP53* es el gen más frecuentemente mutado en cánceres humanos, con más del 50% de los tumores portando mutaciones somáticas que causan pérdida de función. Además de mutaciones adquiridas, los individuos con el síndrome de Li-Fraumeni presentan uno de los alelos del *TP53* inactivado en línea germinal, lo que los predispone a un mayor riesgo de transformación neoplásica, desarrollando un amplio rango de tumores a edades tempranas. Algunas variantes polimórficas en línea germinal también presentan efectos funcionales relacionados con la carcinogénesis, especialmente aquellas variantes *missense* que afectan a la región codificante del gen y determinan un cambio aminoacídico, afectando a la estructura y función de la proteína. Las mutaciones en el *TP53* conducen a un incremento en la proliferacion, el crecimiento celular así como a una reparación del ADN incompleta y a la ausencia de apoptosis. Todos estos fenómenos conducen finalmente al desarrollo de un cáncer (Bai & Zhu, 2006; Haupt *et al*., 2003; Levine & Oren, 2009; Meek, 2009; Ricks-Santi *et al*., 2010; Rogler *et al*., 2011).

Aproximadamente el 50% de los tumores que mantienen el *TP53* activo en su forma funcional presentan alteraciones en vías reguladas por el mismo, tales como mutaciones en genes que actúan *upstream* o *downstream*. Destaca especialmente el protooncogén *MDM2*, por su actuación como un regulador negativo o inhibidor del p53. La amplificación o sobreexpresión del gen *MDM2* aparece en un elevado número de cánceres humanos tales como mama, próstata, colon y varios sarcomas de tejido blando, contribuyendo tanto a la formación como a un crecimiento tumoral acelerado, así como a la ausencia de respuesta terapéutica. Además, los individuos con el síndrome de Li-Fraumeni portadores del alelo G del polimorfismo rs2279744 desarrollan cáncer de 7 a 10 años antes que los individuos homocigotos para el alelo T. De acuerdo con esto, se ha visto que la reducción en los niveles de expresión de *MDM2* inhibe la formación de tumores en ratones (Bai & Zhu, 2006; Knappskog *et al*., 2012; Mandal & Mittal, 2012; Sucheston *et al*., 2011; Xiao, Guo, Yang, Zhao & Wang, 2019).

El descubrimiento de que hasta el 40-50% de los tumores prostáticos avanzados presentaban mutaciones en el *TP53* llevó a considerar que las alteraciones en este gen eran más bien eventos tardíos que ocurren durante la progresión carcinogénica más que al inicio de ella. Las mutaciones en este gen se han asociado con una enfermedad más agresiva, la presencia de metástasis y la transición desde un crecimiento andrógeno-dependiente a otro andrógeno-independiente, que conduce finalmente a la resistencia hormonal. No obstante, las alteraciones en el gen *TP53* se han detectado tanto en tumores primarios como metastásicos, con una frecuencia del 10-35% en los estadios tempranos de la enfermedad (Lu *et al*., 2014; Stoehr *et al*., 2008; Wein *et al*., 2008). Por su parte, la sobreexpresión del *MDM2* se ha observado hasta en un 30-45% de los carcinomas prostáticos, asociándose con estadios tumorales avanzados, la metástasis, el incremento en la proliferación celular y un mal pronóstico (Stoehr *et al*., 2008; Sun *et al*., 2010; Xue *et al*., 2016).

rs1042522 (*TP53*)

Dado el elevado número de estudios caso-control que se han publicado asociando el polimorfismo rs1042522 con distintos tipos de cáncer, se revisaron los resultados derivados de los estudios más recientes. En algunos trabajos no se ha encontrado asociación estadísticamente

significativa entre este SNP y el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Aceto *et al*., 2019; Ali *et al*., 2017; Alsbeith *et al*., 2017; Asadi *et al*., 2017; Avirmed *et al*., 2017; Cai *et al*., 2017; Fu *et al*., 2017; da Rocha Boeira *et al*., 2018; Govindasamy *et al*., 2018; Hao, Xu, Shi, Zhang & Chen, 2018; He *et al*., 2017; Isakova, Talaibekova, Aldasheva, Vinnikov & Aldashev, 2017; Lin *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019; Moradinasab *et al*., 2017; Pouladi *et al*., 2018; Škereňová *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2019).

El alelo C (Pro), especialmente en homocigosis, se ha asociado con un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Ayoubi *et al*., 2018; Hossain *et al*., 2017), cáncer colorrectal (Elsaid *et al*., 2019; Rivu *et al*., 2017), leucemia de células B (Basabaeen *et al*., 2019; Bilous *et al*., 2017) o neuroblastoma (He *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2019). Por el contrario, el genotipo CC se ha relacionado con un efecto protector frente al desarrollo de carcinoma celular escamoso de laringe y faringe (Fenández-Mateos *et al*., 2019) o neuroblastoma (Fu *et al*., 2017).

A pesar del elevado número de estudios que examinan la asociación del rs1042522 con el carcinoma prostático, los resultados son contradictorios entre distintos grupos poblacionales. No se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer de próstata en población japonesa (Hirata *et al*., 2007; Hirata *et al*., 2009), taiwanesa (Huang *et al*., 2004) o eslovaca (Sivoňová *et al*., 2015). Se ha desvelado un aumento en el riesgo de PCa para los individuos portadores del genotipo CC (ProPro) en población chilena (Quiñones *et al*., 2006) y en hombres de población japonesa con una historia familiar positiva (Suzuki *et al*., 2003). En población taiwanesa la susceptibilidad se ha asociado con el alelo C (Pro), tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentando, además, una mayor probabilidad de metástasis (Wu *et al*., 2004). En población india el incremento en el riesgo de PCa solo se ha asociado con los individuos portadores del genotipo heterocigoto CG (ProArg) (Mittal, George, Mishra, Mittal & Kapoor, 2011).

Por el contrario, la variante G (Arg) del rs1042522, en homocigosis y heterocigosis, se ha vinculado con una mayor predisposición al cáncer de próstata en población de ascendencia africana (Ricks-Santi *et al*., 2010) y china (Xu *et al*., 2010). El genotipo GG se ha relacionado con un aumento en el riesgo de PCa para población de origen Caucasoide (Henner *et al*., 2001), Monogoloide (Xue *et al*., 2016) o de ancestralidad diversa (Henner *et al*., 2001). La relación tampoco es concluyente cuando se estratifica la muestra por edad, ya que tanto el alelo C (Rogler *et al*., 2011) como el G (Sun *et al*., 2010) se han vinculado con una mayor predisposición al PCa de inicio temprano (<60 años).

Dada la enorme diversidad de resultados encontrados en las distintas poblaciones, este estudio podría ayudar a esclarecer el comportamiento de este marcador en el desarrollo de la enfermedad.

rs2279744 (*MDM2*)

Como en el caso anterior, para el rs2279744 se revisaron los resultados de los estudios caso-control publicados más recientemente. En varios estudios no se ha encontrado asociación entre este SNP y el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Afshari *et al*., 2017; Avirmed *et al*., 2017; Bilous *et al*., 2017; Isakova *et al*., 2017; Maurei-Milan *et al*., 2019; Miedl, Lebhard, Ehart & Schreiber, 2019; Varmazyar *et al*., 2017; Yilmaz, Tas, Kacan, Sari & Silig, 2017).

La variante G se ha asociado mayoritariamente con un aumento en el riesgo de varios tipos de cáncer, como el de laringe (Fernández-Mateos *et al*., 2019), el de pulmón (Li, Wang, Deng & Tang, 2017), el gástrico (Tas *et al*., 2017), el de esófago (Xiao *et al*., 2019), el de mama (Yilmaz, Tas, Donmez, Kacan & Silig, 2018) o el colorrectal (Yueh *et al*., 2018). Se ha visto, además, que esta variante atenúa el efecto del p53 y acelera el proceso de carcinogénesis (Bond *et al*., 2004).

Con respecto al cáncer de próstata, no se ha descrito un riesgo diferencial a padecer este cáncer en función de las distintas variantes genéticas del rs2279744 en población japonesa (Hirata *et al*., 2009), alemana (Stoehr *et al*., 2008) o china (Xu *et al*., 2010; Xue *et al*., 2016). En población americana de ascendencia europea se ha visto que la presencia de al menos una copia del alelo T se asocia con un incremento en el riesgo de desarrollar carcinoma prostático, efecto especialmente fuerte en la enfermedad avanzada andrógeno-independiente y en individuos con un diagnóstico temprano (≤64 años) (Kibel *et al*., 2008). De acuerdo con estos resultados, se ha encontrado un incremento en el riesgo de padecer carcinoma de próstata a edades tempranas (≤60 años) para los individuos portadores tanto de un alelo T como dos alelos T en población Caucasoide estadounidense (Sun *et al*., 2010). En población india, el riesgo de PCa se ha asociado solo con el genotipo TT (Mandal & Mittal, 2012).

rs937283 (*MDM2*)

El número de estudios del rs937283 es muy inferior al de los otros dos polimorfismos, por lo que no se limitó su revisión a un período en concreto. En varios casos no se ha descrito una influencia de este polimorfismo en la susceptibilidad a varios tipos de cáncer (Chen *et al*., 2018; Chen, Wang, Chen, Gu & Feng, 2018; de Oliveira Reis *et al*., 2012; Jin *et al*., 2012; Li *et al*., 2006; Wang *et al*., 2008; Yu *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2013).

En población infantil china (Jiao *et al*., 2016) se ha encontrado que los individuos portadores de la variante G presentan más riesgo de desarrollar retinoblastoma, comparado con aquellos portadores de la variante A. Este efecto se ha observado en heterocigosis y especialmente en homocigosis. El aumento en la susceptibilidad para los sujetos portadores del alelo G, sobre todo para aquellos homocigotos GG, también se ha visto en carcinoma de mama (Chen *et al*., 2018), de hígado (Chen *et al*., 2018), de pulmón (Chen *et al*., 2018), oral (Chen *et al*., 2010), o de laringe (Wang & Ma, 2015).

Hasta el momento no se ha publicado ningún estudio de asociación entre el rs937283 del gen *MDM2* y el carcinoma prostático, por lo que el trabajo con población gallega aportaría información inédita acerca de su influencia en el PCa.

rs1042522 (*TP53*)-rs2279744 (*MDM2*)-rs937283 (*MDM2*)

Se ha encontrado una interacción entre los polimorfismos localizados en el gen *MDM2* y el inicio del cáncer. Tomando como referencia los individuos portadores del alelo G (rs2279744) y del genotipo AA (rs937283), se ha visto que los sujetos con la combinación TT-G presentan un riesgo alto de desarrollar carcinoma oral y aquellos con las combinaciones G-G o TT-AA presentan un riesgo intermedio (Chen *et al*., 2010).

Del mismo modo, se ha descrito asociación entre estos dos polimorfismos y el rs1042522 del gen *TP53*. Los individuos con 2-3 genotipos de riesgo, considerando genotipos de riesgo el GT y GG del rs2279744, el AA del rs937283 y el CC del rs1042522, presentaron una mayor probabilidad de padecer carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello. Este efecto era más pronunciado entre individuos jóvenes (≤57 años), de sexo masculino o consumidores de tabaco y alcohol (Yu *et al*., 2011).

En referencia al cáncer de próstata, se ha visto que los individuos con la combinación GT+TT (rs2279744) y ArgPro+ProPro (rs1042522) presentan un efecto protectivo con respecto de aquellos GG-ArgPro+ProPro (Xue *et al*., 2016). La interacción entre los tres polimorfismos desvela que los individuos portadores de 3 a 5 alelos de riesgo (rs937283G-rs2279744G-rs1042522G) presentan un aumento en la susceptibilidad en comparación con aquellos portadores de 0 a 2 variantes de riesgo, efecto que se acentúa en individuos jóvenes y no fumadores (Xu *et al*., 2010).

El efecto conjunto de estos tres marcadores en el cáncer de próstata solo ha sido contrastado en grupos poblacionales de origen chino. Por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente estudio serían los primeros en valorar la influencia conjunta de estos polimorfismos en población de ancestralidad europea.

1.4.6. Marcadores del ciclo celular.

El ciclo de una célula eucariota es el proceso por el cual una célula madre da lugar a dos células hijas idénticas. Aparece constituido por cuatro fases: G_1, S, G_2 y M (Fig. 54). En la fase S se produce la síntesis o replicación del ADN mientras que en la fase M se lleva a cabo la división celular, constituida por 2 fases, mitosis y citocinesis. Las fases G_1 y G_2 son intervalos en donde la célula sintetiza ARN y proteínas, experimenta crecimiento celular y se prepara para los acontecimientos de la fase S (G_1) o de la fase M (G_2). La progresión a través del ciclo celular está regulada por una serie de complejos formados por ciclinas y kinasas dependientes de ciclina (CDK) que actúan en las distintas fases del ciclo. El complejo ciclina D-CDK4/6 regula la progresión a través de la fase G_1, el ciclina E/CDK2 se encarga de la transición G_1-S, el ciclina A/CDK2 regula la progresión a través de la fase S y los complejos ciclina A-CDK1 y ciclina B-CDK1 se encargan de la transición G_2/M. La actividad de estos conjuntos ciclina/CDK se regula por la acción de inhibidores específicos denominados CKI (CDK *inhibitors*) (QIAGEN).

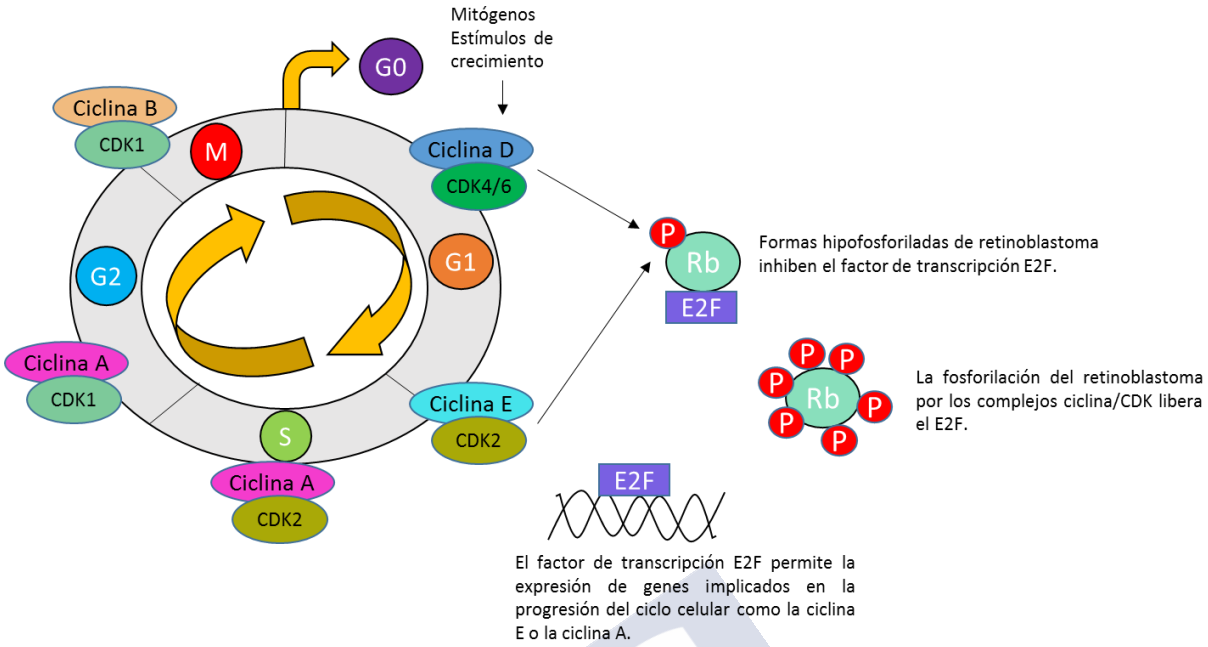

Figura 54. Regulación de la progresión a través del ciclo celular.

1.4.6.1. p21 (*CDKN1A*).

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La proteína p21, también conocida como $p21^{CIP1}$, $p21^{waf1}$ o $p21^{CDKN1A}$, es el miembro fundador de la familia CIP/KIP de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas, que incluye también a p27 y a p57. Se trata de una proteína con un peso molecular de 21kDa y un total de 164 aminoácidos. Estructuralmente cuenta con 5 dominios bien definidos, incluyendo dos dominios de unión a ciclinas, uno en el extremo N terminal (Cy1) y otro en el extremo C terminal (Cy2), un dominio de unión a kinasas dependientes de ciclinas (CDK), un sitio de unión al antígeno nuclear de proliferación celular (PNCA) y una señal de localización nuclear (NLS) para su importación al núcleo de la célula (Fig. 55) (Blundell, 2006; Cazzalini, Scovasi, Savio, Stivala & Prosperi, 2010; Jung, Qian & Chen, 2010).

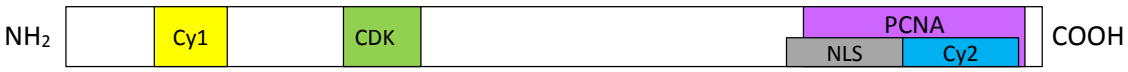

Figura 55. Estructura molecular de la proteína p21.

Concentraciones bajas de la proteína p21 pueden ayudar a formar los complejos ciclina/CDK (especialmente el ciclina D-CDK4/6) y favorecer el progreso a través del ciclo celular. No obstante, a concentraciones óptimas, la verdadera función de esta proteína es actuar como un inhibidor de estos complejos (Fig. 56). El inhibidor p21 es el principal blanco

transcripcional de la proteína p53 ante un daño en el ADN, causando la detención del ciclo celular en distintos puntos de control, lo cual proporciona suficiente tiempo para que el daño sea reparado antes de la transmisión a las células hijas (Abbas & Dutta, 2009; Abukhdeir & Park, 2008; Cazzalini *et al*., 2010; Gartel & Tyner, 2002; QIAGEN).

La proteína p21 inhibe el complejo ciclina E/CDK2, resultando en una detención del ciclo celular en la fase G_1 (Fig. 56). Este complejo se encarga de fosforilar la proteína retinoblastoma, la cual en condiciones normales se encuentra hipofosforilada secuestrando el factor E2F. La fosforilación del retinoblastoma permite la liberación del factor E2F, el cual se une a la región promotora de genes diana, favoreciendo la expresión de proteínas implicadas en la progresión a la fase S, como la ciclina A (Fig. 54). La proteína p21 también puede inhibir el complejo ciclina A/CDK2, el cual se necesita para la progresión a través de la fase S (Fig. 56).

Aunque el principal papel de la proteína p21 es inducir la detención del ciclo celular en la fase G_1/S, también ejerce un papel inhibidor sobre otros complejos. De este modo, puede inhibir los complejos ciclina A/CDK1 y ciclina B/CDK1, impidiendo la entrada en la fase G_2 y la transición G_2/M, respectivamente (Fig. 56). La inhibición de estos complejos permite que la proteína retinoblastoma continúe hipofosforilada, impidiendo que el factor E2F actúe favoreciendo la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (Fig. 54). (Abbas & Dutta, 2009; Abukhdeir & Park, 2008; Cazzalini *et al*., 2010; Gartel & Tyner, 2002; QIAGEN).

Además de su papel en la inhibición de la progresión celular a través de los dominios CDK y Cy, la proteína p21 puede inhibir directamente la síntesis del ADN por medio de la unión con su dominio carboxi-terminal al antígeno nuclear de células en proliferación (Fig. 55; Fig. 56). El PCNA se sintetiza en la fase S y actúa como cofactor de la ADN polimerasa delta para favorecer la replicación del ADN, así como la reparación del mismo. Se sabe que la proteína p21 se une al PCNA en una región que permite el desplazamiento de las enzimas de la replicación, bloqueando su función en la síntesis del ADN sin interferir con su papel en la reparación (Abbas & Dutta, 2009; Blundell, 2006; Cazzalini *et al*., 2010).

La proteína p21 puede promover la inhibición del ciclo celular por medio de la represión transcripcional de genes como el *E2F1* (Abbas & Dutta, 2009). El efecto de p21 sobre la transcripción también depende de la capacidad de unirse a los elementos CDE y CHR, secuencias de ADN situadas en la región promotora de genes cuya regulación transcipcional es dependiente del ciclo celular. La interacción con estos elementos inhibe la expresión de genes involucrados en la proliferación celular como el *BIRC5* (Fig. 56) (Abbas & Dutta, 2009; Cazzalini *et al*., 2010).

En el núcleo de la célula la proteína p21 funciona como un agente anti-proliferativo, pero en el citoplasma parece ejercer un papel anti-apoptótico (Fig. 56). La fosforilación de esta proteína en el residuo Thr^{145} (NLS) por la kinasa pro-supervivencia Akt/PKB previene su desplazamiento al núcleo y estabiliza p21 en el citoplasma (Abbas & Dutta, 2009).

En ausencia de p21 las células con daño en el ADN experimentan los cambios morfológicos típicos de la apoptosis, sugiriendo que el p21 ejerce una función anti-apoptótica (Cazzalini *et al*., 2010). El mecanismo por el cual p21 regula negativamente la muerte celular ante un daño en el ADN deriva de su capacidad de unirse a proteínas reguladoras de la apoptosis (Fig. 56). Así, esta proteína interactúa físicamente por medio de su extremo amino-terminal con la procaspasa-3, impidiendo su transformación en la forma activa de la proteína, bloqueando de forma directa la fase de ejecución de la apoptosis (Cazzalini *et al*., 2010). Paradójicamente, la

propia caspasa-3 es capaz de escindir a p21 en un fragmento de 15 kDa que pierde la capacidad anti-apoptótica (Abbas & Dutta, 2009; Mirzayans, Andrais, Kumar & Murray, 2016). Además de la interacción con la caspasa-3, el p21 puede inhibir caspasas iniciadoras como la -8 o la -10 (Abbas & Dutta, 2009).

La proteína p21 también puede ejercer un papel anti-apoptótico formando complejos inhibitorios con kinasas apoptóticas inducidas por estrés como ASK1 o SAPK (Abbas & Dutta, 2009; Cazzalini *et al*., 2010). A nivel transcripcional, el gen *CDKN1A* puede ser reprimido por la proteína Myc, de modo de que la pérdida de la inducción de p21 dirige a las células a una apoptosis dependiente de p53 (Jung *et al*., 2010).

Además de su papel como reguladora del ciclo celular y la apoptosis, la proteína p21 ejerce otras funciones en la senescencia celular, la diferenciación celular, el envejecimiento, la transcripción génica o la reparación del ADN. La respuesta específica que desencadena esta proteína es dependiente del contexto, del tipo celular y del tipo de estrés al que se encuentre sometida la célula (Abbas & Dutta, 2009; Jung *et al*., 2010).

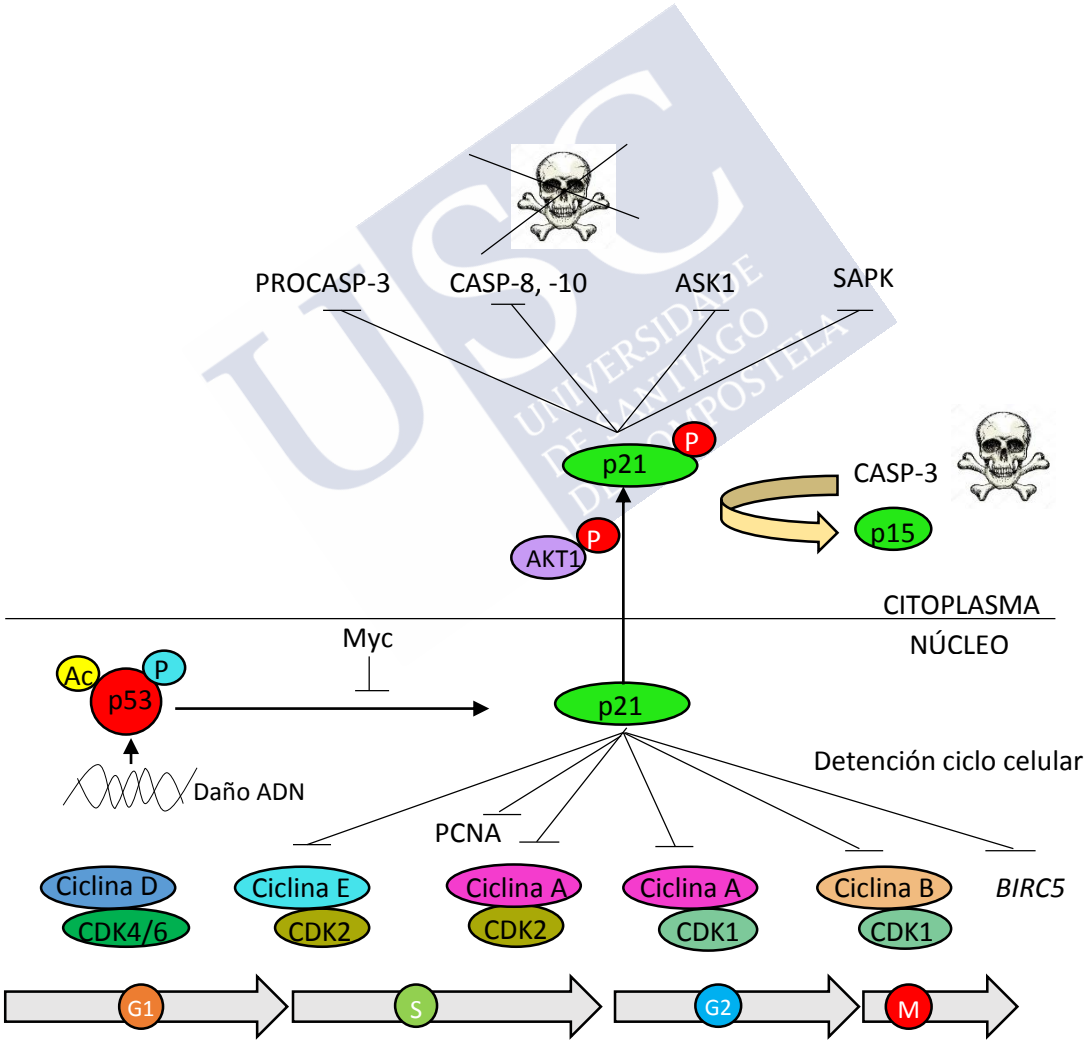

Figura 56. Esquema de la función celular de la proteína p21 en la detención del ciclo celular y la apoptosis.

- ***Contexto genómico.***

La proteína p21 está codificada por el gen *CDKN1A*, situado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.2) y formado por un total de 3 exones, aunque el primer exón no es traducido a proteína (Blundell, 2006; Maglott *et al*., 2011; Yang *et al*., 2016). La ubicación exacta en el cromosoma se muestra en la Figura 57. El gen *CDKN1A* presenta varios elementos de respuesta a p53 en su región promotora y otros elementos en *cis* que regulan su actividad transcripcional (Jung *et al*., 2010).

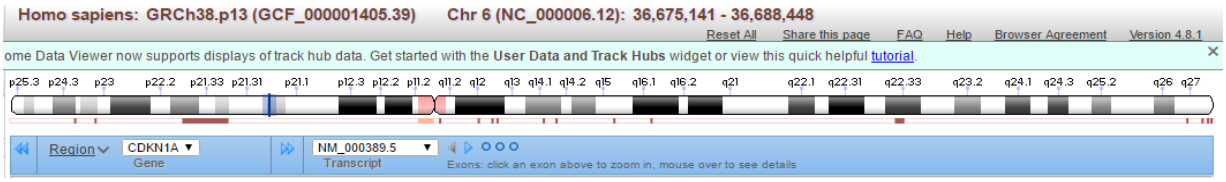

Figura 57. Localización cromosómica del gen *CDKN1A*. Tomada de Maglott *et al*., 2011 (NCBI).

En esta tesis doctoral se ha analizado la variabilidad alélica del rs2395655, el cual supone el cambio del alelo A por G (FWD) y se encuentra situado en la región promotora del gen *CDKN1A* (-809A>G) (Sherry *et al*., 2001). Estudios bioinformáticos mostraron que la sustitución de la variante alélica A por la G creaba un elemento de respuesta al estrés (STRE) entre las posiciones -810 y -805. Ensayos con luciferasa mostraron una mayor actividad transcripcional del gen *CDKN1A* en pacientes con carcinoma celular escamoso portadores de la variante alélica G en comparación con aquellos con el alelo A, asociándose los individuos portadores del genotipo GG con una mayor expresión de p21. Este aumento en la actividad transcripcional de p21 se ha relacionado con la unión del factor LEDFG/p75 al elemento STRE. El LEDFG/p75 (*lens epithelium-derived growth factor*) es un factor oncogénico y pro-supervivencia que aumenta el crecimiento celular y la resistencia a la muerte celular por medio de su unión a estos elementos STRE, encontrándose sobreexpresado en varios tipos tumorales como próstata, colon, tiroides, hígado, útero y mama (Guo *et al*., 2019).

El rs2395655 es un SNP altamente polimórfico, con una frecuencia del alelo menor (A) de 0,47. Esta variante es la menos abundante en todas las poblaciones africanas, con una frecuencia media de 0,26. En el Este Asiático el alelo A también es el minoritario, aunque su frecuencia aumenta hasta el 45%. En poblaciones del Sur de Asia y de Europa el alelo A es la variante mayoritaria (0,53 y 0,62, respectivamente) (Fig. 58) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

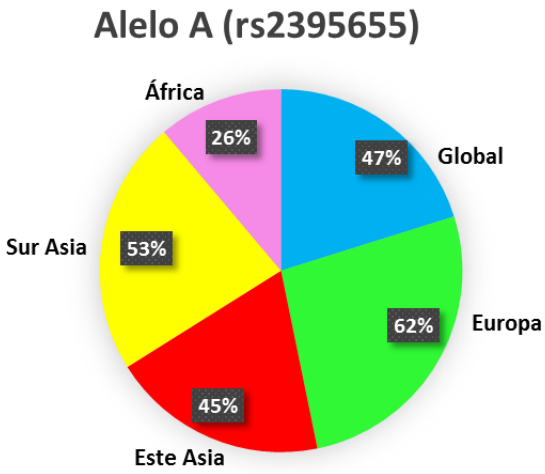

Figura 58. Variabilidad poblacional del rs2395655 (*CDKN1A*) según la frecuencia del alelo menor A. Basada en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

El proceso de carcinogénesis es el resultado de un desequilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis (Shamloo & Usluer, 2019). Muchas de las proteínas que gobiernan estos procesos incluyen reguladores del ciclo celular, como es el caso del inhibidor p21 (Abukhdeir & Park, 2008).

La proteína p21 presenta un efecto antagónico en el desarrollo del cáncer (Gartel & Tyner, 2002). Por una parte, el p21 es capaz de inducir la detención del ciclo celular en respuesta al p53, así como de promover la inhibición directa de la replicación. Esto impide la proliferación de células con daños en el ADN hasta que resulten reparados (Abukhdeir & Park, 2008). Esta función antiproliferativa contribuye a considerar al p21 como un supresor tumoral (Gartel & Tyner, 2002).

La primera evidencia que apoya la actividad supresora tumoral del p21 proviene del descubrimiento de que ratones *Cdkn1a*$^{-/-}$ desarrollaban tumores espontáneos. No obstante, la incidencia tardía de estos tumores comparada con la de aquellos deficientes en otros supresores tumorales como *p53, p16* o *Arf* sugiere que la pérdida de *Cdkn1a* por sí misma no es suficiente para promover la carcinogénesis. Con respecto a tumores humanos, se ha visto una expresión reducida de p21 en carcinoma colorectal, cervical, de cabeza y cuello, o pulmonar. Sin embargo, las mutaciones con pérdida de función del *CDKN1A* son extremadamente raras en cánceres humanos, sugiriendo que el p21 no encaja en la definición clásica de supresor tumoral. En lugar de eso, se ha propuesto que el p21 presenta una actividad sinérgica con otros supresores tumorales y antagoniza otros oncogenes para proteger a las células frente el desarrollo del cáncer. Así, por ejemplo, se ha visto que la delección de *Cdkn1a* acelera la formación de tumores en ratones que expresan una forma mutante de p53 (*Tp53*$^{R172P+/+}$), los cuales pierden la capacidad apoptótica, pero retiene parcialmente su actividad de detención del ciclo celular (Abbas & Dutta, 2010).

Paradójicamente, el p21 también es capaz de inhibir la apoptosis, lo cual contribuye a su actividad oncogénica (Gartel & Tyner, 2002). La capacidad de esta proteína de funcionar como

promotora del cáncer se ha asociado con su acumulación citoplasmática. La proteína p21 aparece sobreexpresada en una variedad de cánceres humanos, incluyendo el de próstata, el cervical, el de mama o los carcinomas de células pequeñas. Además, en muchos casos, esta sobreexpresión se correlaciona positivamente con la agresividad tumoral, la invasividad y un peor pronóstico. La teoría de que la proteína p21 puede funcionar como un oncogén bajo ciertas circunstancias se apoya en el hecho de que la delección en *Cdkn1a* suprime el desarrollo espontáneo de linfomas que surgen en ratones $Tp53^{-/-}$ y $ATM^{-/-}$. De hecho, linfomas que surgen en $Cdkn1a^{-/-}$ exhiben una alta tasa de apoptosis, sugiriendo que la actividad anti-apoptótica de p21 es pro-tumorigénica (Abbas & Dutta, 2010).

Por lo tanto, la expresión del p21 presenta una implicación en los cánceres humanos, pero dependiendo del contexto celular y las circunstancias, puede actuar como un supresor tumoral o como un oncogén (Abbas & Dutta, 2009).

La expresión de la proteína p21 en el cáncer de próstata se ha asociado con una supervivencia reducida y con la progresión de la enfermedad desde un estado andrógeno-dependiente a otro andrógeno-independiente (Fizazi *et al*., 2002). Estos resultados sugieren que el p21 podría ejercer un efecto anti-apoptótico o pro-supervivencia en células de carcinoma de próstata. Para evaluar esta hipótesis, se examinaron los niveles de p21 en líneas celulares de PCa en respuesta al estrés. Los investigadores comprobaron que niveles reducidos de esta proteína sensibiliza a las líneas celulares de carcinoma prostático a la apoptosis inducida por deprivación de factores de crecimiento y agentes que dañan al ADN (Martínez *et al*., 2002). Estos resultados sugieren que la proteína p21 protege a las células de PCa de la apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés celular.

No se ha descrito asociación del polimorfismo rs2395655 con el cáncer de mama (Driver *et al*., 2008), el cáncer cervical (Wang *et al*., 2012) o el cáncer de ovario (Goode *et al*., 2009). Por el contrario, en un proyecto colaborativo que cuenta con la participación de 10 países europeos, se ha encontrado que el alelo G de este SNP, especialmente en homocigosis, se asociaba con un incremento en el riesgo de padecer cáncer del tracto aerodigestivo superior (Canova *et al*., 2009).

Se han publicado varios estudios en población china valorando la asociación entre el rs2395655 y el carcinoma de esófago. En el trabajo de Zheng y colaboradores, (2014) no se ha observado una relación significativa con este cáncer. Por el contrario, otros dos estudios en población china (Wang *et al*., 2014; Yang *et al*., 2016) desvelan un incremento en la predisposición a este cáncer para los individuos portadores del alelo G. En el estudio de Yang y colaboradores el efecto de esta variante alélica se manifiesta especialmente al valorar la interacción con el tabaquismo. Estos investigadores encontraron, además, una expresión de la proteína p21 mucho más elevada en tejidos de cáncer de esófago en los individuos con el alelo G frente aquellos con el alelo A.

Dada la absoluta ausencia de datos relativos al comportamiento del rs2395655 en relación con el riesgo al PCa, este aspecto, que se aborda por primera vez en este estudio, únicamente va a poder ser contextualizado en el marco de otras carcinogénesis.

1.4.6.2. p27 (*CDKN1B*).

- ***Estructura molecular y función biológica.***

La proteína p27, también conocida como $p27^{KIP1}$, pertenece a la familia de inhibidores CIP/KIP, los cuales comparten un dominio N-terminal que permite la inhibición de ciclinas (Cy) y CDKs. Esto favorece la detención del ciclo celular en caso de daño al ADN (Besson, Dowdy & Roberts, 2008). Por otra parte, en el extremo C-terminal, la proteína p27 cuenta con una región aminoacídica (aa 144-198) que permite la inhibición directa de la síntesis de ADN por medio de la unión a la proteína MCM7 (*minichromosome maintenane-7*), subunidad de la helicasa de replicación MCMD2-7 (Fig. 59) (Besson *et al*., 2008; Li, Vervoorts, Carloni, Rossetti &Lücher, 2017; Verboorts & Lüscher, 2008).

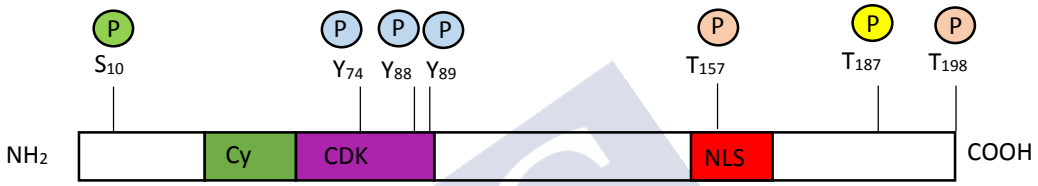

Figura 59. Estructura de la proteína p27. Se indican los distintos residuos aminoacídicos en los que la proteína puede ser fosforilada. S: serina; Y:Tirosina; T: Treonina.

La principal función de la proteína p27 es la detención del ciclo celular en la fase G_1/S por medio de la inhibición de los complejos ciclina E/A-CDK2. La interacción con el complejo ciclina D-CDK4/6 depende del estado de crecimiento de la célula y de la fosforilación de la proteína. De este modo, la proteína p27 puede ejercer un efecto inhibitorio sobre este complejo, pero también participa en su ensamblaje. La unión de p27 a estos complejos impide que la proteína Rb sea fosforilada y se libere el factor de transcripción E2F, responsable de la síntesis de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular. Aunque de forma más débil, la proteína p27 también puede inhibir los complejos ciclina A-CDK1 y ciclina B-CDK1 (Fig. 60) (Abbastabar *et al*., 2018).

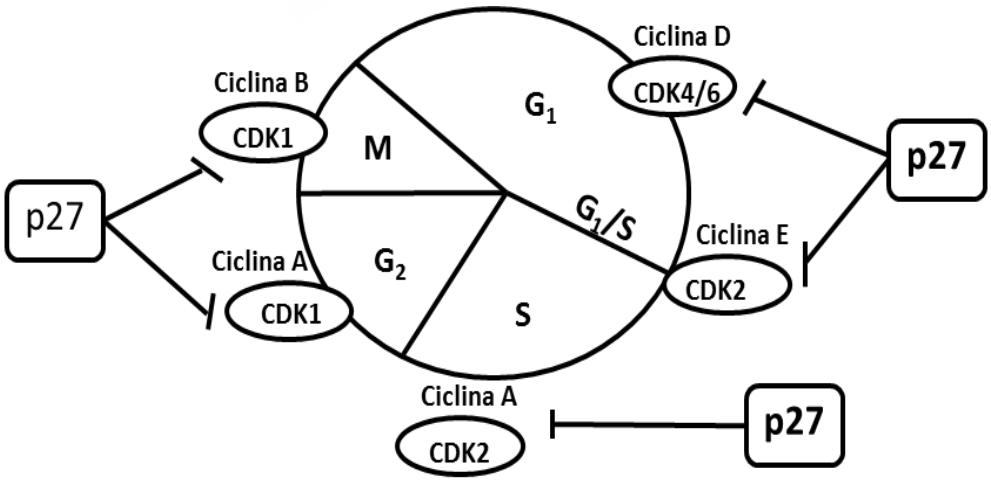

Figura 60. Función celular de la proteína p27 en la detención del ciclo celular.

Múltiples vías estimuladoras de mitógenos, importantes para la proliferación y la supervivencia, inhiben la función de la proteína p27. Destacan principalmente las rutas Ras y PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa), las cuales transmiten la señal de crecimiento al interior de la célula por medio de receptores tirosín kinasa (RTK). Estas vías de señalización inducen la activación de proteínas como c-Myc o Akt, las cuales influencian negativamente la actividad de p27 (Fig. 61) (Ie Sage, Nagel & Agami, 2007; Wander, Zhao & Slingerland, 2011).

La proteína p27 puede ser regulada a nivel transcripcional, principalmente por medio de factores como FOXO (*Forkhead box O proteins*) o Myc, los cuales aumentan o disminuyen, respectivamente, su expresión génica (Abbastar *et al*., 2018; Hnit *et al*., 2015). No obstante, la principal forma de regulación de la proteína se realiza por medio de modificaciones postraduccionales, las cuales determinan su actividad, estabilidad y localización subcelular. Estas modificaciones se refieren a fosforilaciones llevadas a cabo por proteínas oncogénicas en varios residuos aminoacídicos de la proteína p27, incluyendo tirosina (Y_{74},Y_{88},Y_{89}), treonina (T_{157},T_{187},T_{198}) y serina (S_{10}) (Fig. 59) (Abbastar *et al*., 2018; Hnit *et al*., 2015).

El nivel de proteína p27 en el núcleo es controlado por medio de ubiquitinación, seguida de proteolisis. Esto requiere la fosforilación previa de la proteína p27 en el aminoacido T_{187}, llevada a cabo por el complejo ciclina E-CDK2. El residuo fosforilado T_{187} es reconocido por la ubiquitín ligasa SCF^{SKP2}, la cual poliubitiquitina la proteína y la marca para su degradación en el proteasoma (Hnit *et al*., 2015). La fosforilación previa en residuos de tirosina (Y_{74}, Y_{88}, Y_{89}), localizados en el sitio inhibitorio de CDKs, permiten que la proteína p27 pierda su actividad inhibitoria sobre el complejo ciclina E-CDK2, pudiendo éste fosforilarla en T_{187} (Chu *et al*., 2008). La fosforilación en estos residuos de tirosina también permite encaminar al complejo ciclina D-CDK4/6-p27 desde un estado inhibitorio del ciclo celular a un estado no inhibitorio (Hnit *et al*, 2015), en el cual se secuestra la proteína p27 impidiendo que ejerza su función sobre el complejo ciclina E-CDK2 (Fig. 61) (Abbastabar *et al*., 2018).

Por otra parte, la fosforilación de p27 en Ser_{10} incrementa la unión a la proteína CRM1 (*chromosome region maintenance 1*), la cual exporta la proteína del núcleo al citoplasma. En el citoplasma, los complejos KPC1 y 2 (*kip1 ubiquitylation-promoting complex*) ubiquitinan la proteína y dirigen su degradación por el proteasoma (Abbastabar *et al*., 2018; Chu, Hengst & Slingerland, 2008; Hnit *et al*., 2015). La fosforilación de p27 en los residuos T_{157} y T_{198} permite el secuestro de la proteína en el citoplasma por su unión a proteínas 14-3-3, bloqueando la importación nuclear y permitiendo la progresión del ciclo celular (Abbastabar *et al*., 2018; Hnit *et al*., 2015). La fosforilación en T_{157} y T_{198} también promueve la inhibición de la vía RhoA/ROCK, dirigiendo a un aumento de la migración celular y la metástasis (Fig. 61) (Chu *et al*., 2008).

Además de su papel en la regulación del ciclo celular, la proteína p27 parece estar implicada en la apoptosis, aunque sus funciones exactas no están esclarecidas (Abbastabar *et al*., 2018). La sobreexpresión de esta proteína puede proteger a las células de la apoptosis, aunque también se han descrito otros efectos pro-apoptóticos (Abbastabar *et al*., 2018; Coqueret, 2003). La apoptosis en células endoteliales deprivadas de factores de crecimiento se ha asociado con la escisión de p27 por parte de la caspasa-3, lo cual conduce a la pérdida de su papel como inhibidor de los complejos ciclina A/E-CDK2. De este modo, la inactivación de la proteína p27 puede ser importante para la inducción de la apoptosis en varios tipos y condiciones celulares (Abbastabar *et al*., 2018; Coqueret., 2003; Sgambato, Cittadini, Faraglia & Weinstein, 2000). Por otra parte, la localización citoplasmática de p27 se ha asociado con la

prevención de la muerte celular impidiendo la liberación del citocromo *c* del espacio intermembrana e inhibiendo la activación de la procaspasa-2 y la procaspasa-3 a las formas maduras (Blagosklonny, 2002; Eymin *et al*., 1999). En línea con estos resultados, la inducción de p27 se ha asociado con la resistencia a la apoptosis inducida por fármacos anti-tumorales (Besson *et al*., 2008).

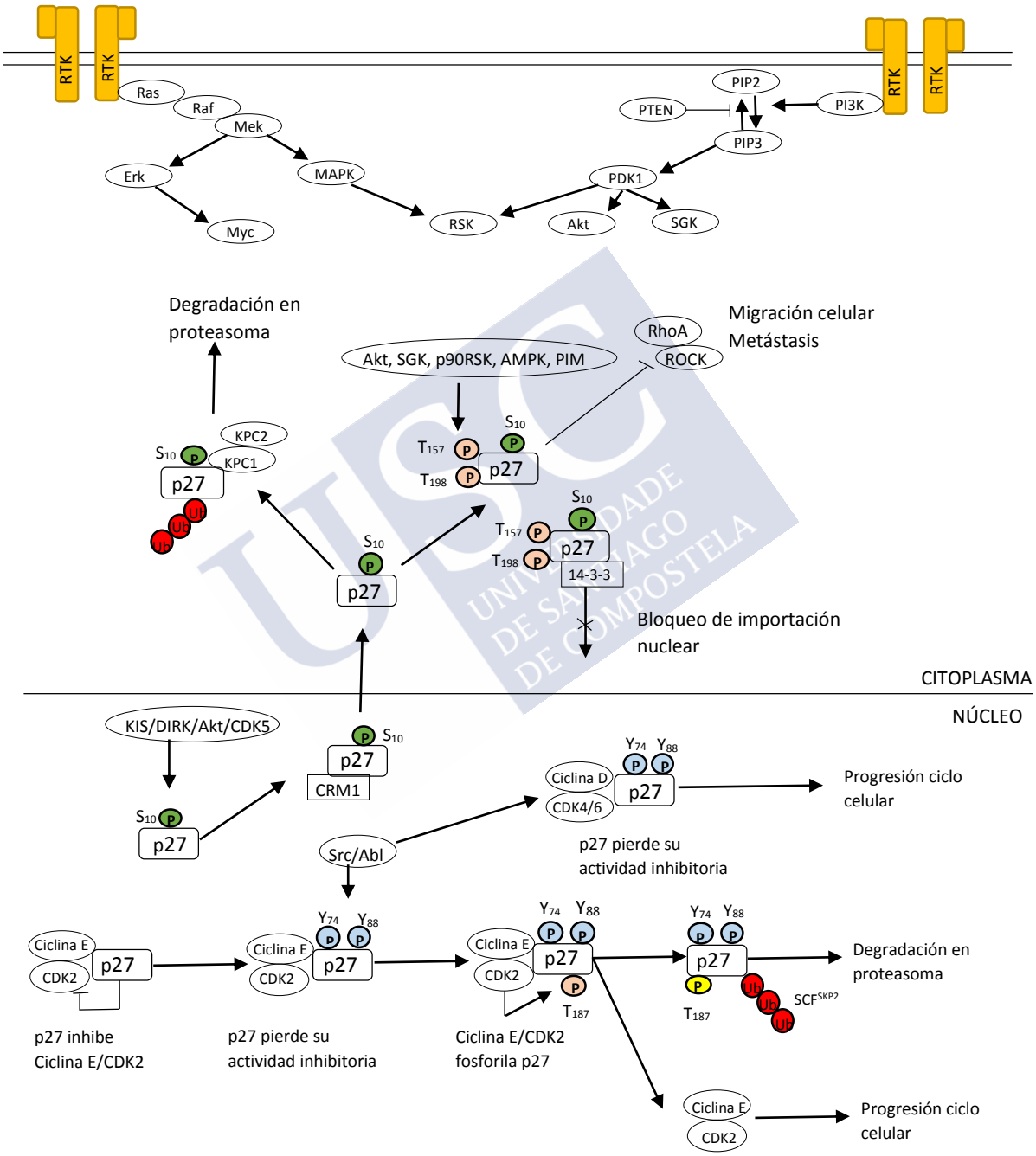

Figura 61. Vías de señalización que regulan la actividad de p27.

- ***Contexto genómico.***

La proteína p27 está codificada por el gen *CDKN1B*, localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.1). Aparece constituido por tres exones y la posición exacta se detalla en la Figura 62. En este trabajo se han estudiado dos marcadores en el *locus CDKN1B*: rs34330 y rs2066827.

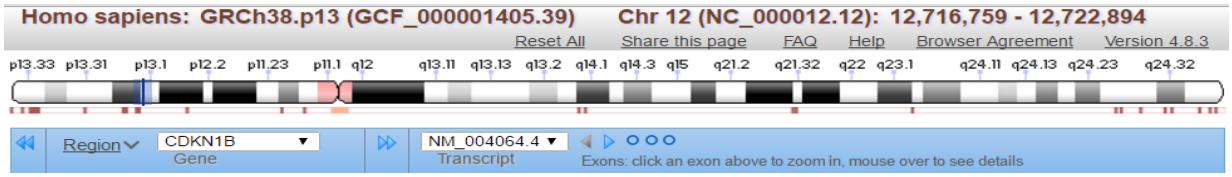

Figura 62. Localización cromosómica del gen *CDKN1B*. Tomada de Maglott *et al.*, 2011 (NCBI).

rs34330 (*CDKN1B*)

El rs34330 (-79 C>T) se encuentra localizado en la región 5´UTR del gen *CDKN1B* e implica el cambio de la variante C por T (FWD) (Sherry *et al*., 2001). Debido a la localización de este SNP en la región promotora, la presencia de una variante alélica u otra podría causar una diferencia en la expresión del gen *CDKN1B*. Apoyando esta hipótesis, los análisis bioinformáticos predicen que el rs34330 está localizado dentro de un sitio de unión a factores de transcripción, como el AP-2a y el SP1 (Landa *et al*., 2010; Lee & Shatkay, 2007). El alelo T y el genotipo TT se han asociado con una menor actividad transcripcional, conduciendo a menores niveles de ARNm y proteína p27 (Capasso *et al*., 2017; Landa *et al*., 2010).

El rs34330 presenta un grado de polimorfismo relativamente elevado a nivel global, con una frecuencia del alelo menor MAF (T) de 0,34. No obstante, esta frecuencia es inferior en poblaciones del Sur Asiático (0,20) o europeas (0,25). Por el contrario, la frecuencia del alelo T es especialmente elevada en grupos del Este Asiático (0,47) y africanos (0,47), siendo la variante alélica más frecuente en muchas poblaciones (Fig. 63).

rs2066827 (*CDKN1B*)

Con respecto al rs2066827 (V109G), se encuentra situado en el exón 1 del gen *CDKN1B*. Se trata de una variante *missense* donde el cambio de la variante alélica T por G (FWD) implica la sustitución del aminoácido valina (V, G**T**C) por glicina (G, G**G**C) en el codón 109 de la proteína p27 (Sherry *et al*., 2001). Se ha visto que la región aminoacídica en la que se encuentra este SNP (97-151) interacciona físicamente con la proteína $p38^{JAB1}$ (*Jun activation domain binding protein 1*), la cual funciona como un regulador negativo de la proteína p27 al promover su fosforilación. Esta fosforilación dirige la translocación de p27 del núcleo al citoplasma y desencadena su degradación por el sistema ubiquitin-proteasoma (Tomoda, Kubota & Kato, 1999). Aunque los análisis bioinformáticos han confirmado que la sustitución aminoacídica no presenta un efecto deletéreo (Savas, Ahmad, Shariff, Kim & Ozcelik, 2005), se ha propuesto que el polimorfismo V109G podría modificar la afinidad de la proteína $p38^{JAB1}$ por la proteína p27, aumentando su exportación y degración en el citoplasma (Chen *et al*., 2010; Figueiredo *et al*., 2007).

El rs2066827 presenta una frecuencia media del alelo menor (G) bastante alta: 0,36. No obstante, este alelo es muy poco frecuente en poblaciones del Este Asiático (0,06). En poblaciones europeas y del Sur Asiático esta variante también es la minoritaria, aunque con frecuencias superiores que las encontradas en el Este Asiático (0,24 y 0,32, respectivamente). Por el contrario, en poblaciones africanas el alelo G es la variante más frecuente, llegando a alcanzar el 83% en alguna subpoblación (Fig. 63).

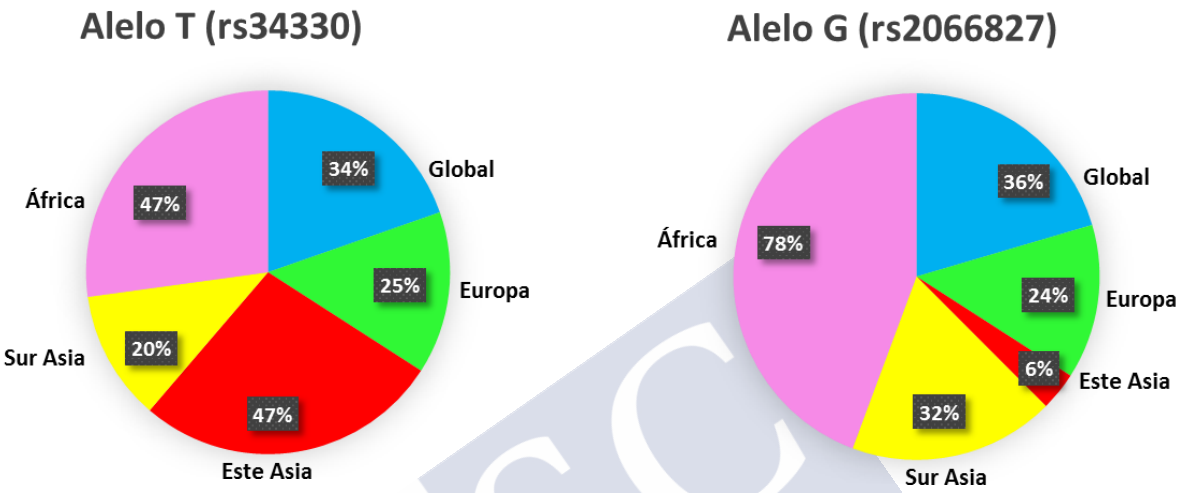

Figura 63. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs34330 (*CDKN1B*) y rs2066827 (*CDKN1B*) según la frecuencia de los alelos menores T y G, respectivamente. Basadas en *The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*.

- ***Relación con el cáncer.***

Las alteraciones en el correcto funcionamiento del ciclo celular desempeñan un papel clave en el desarrollo del cáncer. Las proteínas involucradas en este proceso celular aseguran la correcta replicación del ADN y separación de los cromosomas (Barbieri *et al*., 2014). De este modo, los genes que ejercen su función deteniendo el ciclo celular son críticos para evitar mutaciones carcinogénicas, permitiendo la actuación de los sistemas de reparación de ADN (Francisco *et al*., 2013). Un defecto en estas proteínas podría favorecer la proliferación de células con mutaciones, predisponiendo al cáncer (Driver *et al*., 2008).

La proteína p27 funciona como un supresor tumoral inhibiendo la actividad de los complejos ciclina-CDK, lo que permite el bloqueo de la proliferación de células potencialmente cancerígenas (Abbastabar *et al*., 2018). Se ha visto que los ratones deficientes en p27 son significativamente más grandes que los ratones salvajes, exhibiendo hipertrofia prostática y desarrollo de tumores pituitarios. Esto sugiere que la disrupción de p27 potencia el crecimiento celular, y en algunos tejidos, el desarrollo tumoral. El comportamiento de esta proteína en ratones parece ser haploinsuficiente para la supresión tumoral, ya que tanto ratones homocigotos para la delección de p27 ($p27^{-/-}$) como heterocigotos ($p27^{-/+}$) muestran un incremento en la predisposición a desarrollar tumores en múltiples tejidos tras la exposición a diferentes carcinógenos. Esto sugiere que la inactivación de uno de los alelos del gen *CDKN1B* es suficiente para predisponer a la tumorigénesis (Bloom & Pagano, 2003; Sgambato *et al*.,

2000). Además, modelos murinos sugieren que el p27 colabora con el p53 para modular el ciclo celular y suprimir la oncogénesis de una manera tejido específica (Grochola *et al*., 2010).

Aunque la proteína p27 presenta una función haploinsuficiente en modelos murinos, en cánceres humanos la pérdida de un alelo del gen *CDKN1B* es infrecuente y la mutación del segundo alelo solo ocurre en muy raras ocasiones. No obstante, la reducción en la expresión de la proteína p27 se ha encontrado en una amplia variedad de tumores humanos, relacionándose con un grado tumoral más avanzado y un mal pronóstico. Esto sugiere un papel supresor tumoral para la proteína p27 en humanos aunque no se ajuste a los requisitos establecidos por la hipótesis de Knudson (Bloom & Pagano, 2003; Landa *et al*., 2010; Li *et al*., 2004).

Varios estudios clínicos y experimentos de laboratorio han demostrado que el p27 es un importante supresor tumoral en la etiología del PCa (Han, Shan, Hu, Zhang & Zhang, 2015). De este modo, los ratones deficientes en *CDKN1B* desarrollan hiperplasia prostática (Cordon-Cardo *et al*., 1998; Wein *et al*., 2008) y presentan una elevada incidencia de cáncer de próstata, especialmente en conjunto con otros supresores tumorales como *PTEN* (Di Cristófano, De Acetis, Koff, Cordon-Cardo & Pandolfi, 2001; Wein *et al*., 2008).

En humanos, se ha descrito una pérdida de expresión del *CDKN1B* en carcinoma prostático, lo cual podría ser detectado en muestras de biopsia, aumentando la posibilidad de que pueda sea un marcador útil en el diagnóstico de PCa (Thomas *et al*., 2000; Wein *et al*., 2008). Otros estudios han demostrado una disminución en la expresión de p27 en tejidos con carcinogénesis prostática respecto de tejidos sanos (Zhu *et al*., 2019) y que su expresión disminuye progresivamente con el incremento del grado y estadio tumoral (Cordon-Cardo *et al*., 1998; Cote *et al*., 1998; Kibel *et al*., 2003; Macri & Loda, 1999).

Contrariamente a su papel como supresor tumoral en el núcleo de la célula, se ha visto que el secuestro de p27 en el citoplasma convierte a esta proteína en oncogénica debido a la incapacidad de inhibir los complejos ciclina-CDK, a su función anti-apoptótica o a su participación en la migración celular y metástasis por medio de la inhibición de la vía RhoA/ROCK (Fig. 61) (Abbastabar *et al*., 2018; Chu *et al*., 2008). El potencial invasivo de esta proteína podría explicar por qué aparece raramente mutada en cánceres humanos (Chu *et al*., 2008). La localización citoplasmática de p27 se ha asociado con un mal pronóstico en varios carcinomas, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario y adenocarcinoma de esófago (Abbastabar *et al*., 2018). Como se ha comentado anteriormente, la exportación nuclear y el secuestro en el citoplasma está regulado principalmente por vías oncogénicas como PI3K/Akt o Ras/MAPK, las cuales dirigen la fosforilación de la proteína en distintos residuos aminoacídicos y contribuyen a la formación tumoral (Fig. 61) (Abbastabar *et al*., 2018; Wander *et al*., 2011).

rs34330 (*CDKN1B*)

En varios estudios no se ha encontrado asociación entre el rs34330 y el riesgo a desarrollar distintos tipos de cáncer (Barbieri *et al*., 2014; Goode *et al*., 2009; Wu *et al*., 2006; Ye *et al*., 2008). Sin embargo, el alelo T de este SNP se ha vinculado con una mayor predisposición al neuroblastoma (Capasso *et al*., 2017), al carcinoma endometrial (Cai *et al*., 2011), al carcinoma pulmonar (Wang *et al*., 2007), al carcinoma hepatocelular (Liu *et al*., 2013) o al cáncer de mama (Ma *et al*., 2006). El aumento en el riesgo de cáncer de tiroides (Landa *et al*., 2010) o de cáncer

de mama en población británica (Driver *et al*., 2008) se ha asociado exclusivamente con los individuos portadores del alelo T en homocigosis.

Hasta el momento no se ha publicado ningún estudio tipo caso-control valorando la influencia del polimorfismo rs34330 en el desarrollo de cáncer de próstata, por lo que resulta relevante analizar tal asociación en este trabajo.

rs2066827 (*CDKN1B*)

En cuanto al rs2066827, parece no tener influencia en la incidencia de una variedad de tipos tumorales (Capasso *et al*., 2017; Chen *et al*., 2010; Driver *et al*., 2008; Ma *et al*., 2006; Landa *et al*., 2010; Liu *et al*., 2013). No obstante, se ha encontrado un efecto protector del alelo G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, frente al desarrollo de cáncer de mama (Figueiredo *et al*., 2007), melanoma (Francsico *et al*., 2013) o cáncer de ovario (Goode *et al*., 2009). El alelo G en homocigosis también se ha vinculado con un descenso en el riesgo de padecer carcinoma de tiroides (Barbieri *et al*., 2014) o de ovario en población de ancestralidad europea (Quaye *et al*., 2009).

Por el contrario, la variante alélica G se ha asociado con un aumento en la predisposición a desarrollar cáncer de pulmón (Zilani *et al*., 2018). En cáncer de cabeza y cuello (Li *et al*., 2004) o carcinoma de ovario (Mohamed, Hussien, AlBakry, Mohamed & Said, 2013) la susceptibilidad se ha vinculado especialmente con el genotipo GG.

En lo que respecta al carcinoma prostático, el rs2066827 no parece tener un efecto diferencial en población taiwanesa (Huang *et al*., 2008) o china (Zhang *et al*., 2018). Sin embargo, un estudio en población china (Han *et al*., 2015) y otro llevado a cabo en individuos americanos Caucasoides (Kibel *et al*., 2003) desvelan un efecto protector para los hombres portadores del alelo G en homocigosis.

A pesar de que se ha estudiado la relación entre el polimorfismo rs2066827 y el PCa en poblaciones de diverso transfondo genético, no se ha publicado ningún estudio en el continente europeo, por lo que el trabajo en población de Galicia aportaría información fundamental para desvelar el comportamiento de este marcador en poblaciones de ancestralidad europea.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS.

Esta tesis doctoral pretende cumplir los siguientes objetivos:

- Analizar la variabilidad molecular de marcadores del genoma humano moduladores de la apoptosis y el ciclo celular en una muestra de la población de Galicia. Estima de las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de nucleótido simple.

- Estudiar la asociación de la variabilidad alélica de dichos marcadores con la susceptibilidad diferencial de los individuos a desarrollar cáncer de próstata por medio de coeficientes *Odds Ratio*. Se pretenden abordar dos aspectos fundamentales de un estudio de tipo caso-control:

    - Identificar las variantes alélicas y genotípicas de riesgo/protección en el desarrollo del PCa para cada uno de los marcadores genético-moleculares analizados.

    - Establecer una valoración cuantitativa de dicho impacto.

- Valorar la interacción de los marcadores con factores del entorno celular (edad, tabaquismo e índice de masa corporal). Esto es, desvelar estratos de la población donde el efecto de las variantes del polimorfismo en el desarrollo del cáncer de próstata pudieran manifestarse.

- Identificar posibles interacciones entre marcadores que pudieran modular conjuntamente la susceptibilidad de los individuos a la enfermedad. Pretende abordarse, por lo tanto, el estudio de combinaciones entre genes localizados en la misma vía metabólica.

3. HIPÓTESIS DE PARTIDA.

Para llevar a cabo este estudio se parte de la hipótesis de que las muestras de casos y controles pertenecen a la misma población y que, como tal, no existen diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de individuos sanos e individuos afectados por PCa.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La presente tesis doctoral se ha diseñado de acuerdo con una metodología de estudio epidemiológico de casos y controles. En consecuencia, se trata de un estudio de tipo retrospectivo, lo cual significa que a partir de la información obtenida de los individuos de ambos grupos se investigan los posibles factores de riesgo a los que pueden haber estado expuestos y que pueden haber contribuido al desarrollo de la enfermedad. Se evalúa cómo la variabilidad alélica de diferentes genes candidatos puede conducir a un riesgo diferencial a desencadenar la carcinogénesis prostática. Este análisis se efectúa en función, no solo sobre la base de tal variabilidad alélica, sino además sobre cómo la convergencia de diferentes factores (estilos de vida, exposición ambiental…) pueden conducir a un riesgo/protección diferencial.

Dada la naturaleza del diseño, se usan casos incidentes, o de reciente diagnóstico, y el grupo de los controles presenta características similares al de los casos, excepto por la ausencia de cáncer de próstata. Aunque su principal aplicación es la búsqueda de causalidad o factores etiológicos, este tipo de estudios también se utilizan a nivel de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades (Gómez-Gómez, Danglot-Banck, Alvarado & García de la Torre, 2003; Keogh & Cox, 2014; Piedrola Gil, 2002).

Las muestras incluidas en la tesis doctoral cuentan con la aprobación del comité ético de investigación clínica de Galicia y forman parte del estudio con el código de registro 2008/164.

4.1. MUESTRA DE ESTUDIO.

4.1.1. Área de estudio y criterios de selección.

La muestra de estudio se ha establecido a partir de individuos pertenecientes a la población de Galicia seleccionados en las áreas sanitarias de Ferrol, Santiago y Pontevedra. Los criterios que se utilizaron para la selección de los individuos fueron los siguientes:

- Individuos de sexo masculino, aleatoriamente obtenidos de la población y sin relaciones de parentesco biológico.
- Condición de autoctonía de la población de Galicia al menos dos generaciones precedentes, con el objetivo de obviar las posibles distorsiones estadísticas derivadas de los fenómenos de subestructura poblacional (efecto Wahlund) (Li, 1976).

En el grupo de casos se han tenido en cuenta los siguientes criterios:

- Pacientes con cáncer de próstata primario, diagnosticado tras inspección rectal y confirmación por análisis anatomo-patológico.
- Evidencia de niveles plasmáticos de PSA superiores a 4 ng/ml.

Para la selección de controles se han usado los criterios que a continuación se detallan:

- Individuos sin presencia de patología específica, exceptuando patologías banales o traumatismos.
- Niveles séricos de PSA menores o iguales a 4 ng/ml.
- Sin evidencia de proceso carcinogénico alguno en su historial clínico.

De acuerdo con estos criterios de selección, se han reclutado un total de 540 individuos, de los cuales 291 son casos diagnosticados con cáncer de próstata y 249 corresponden a individuos control, sin patología aparente.

4.1.2. Criterios bioéticos.

El presente estudio se ha llevado a cabo siguiendo los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Los individuos participantes en el estudio se encontraban en plena posesión de sus facultades mentales en el momento del muestreo y no sufrieron daño alguno durante su desarrollo. El trabajo se ha realizado con el único beneficio de contribuir al conocimiento sobre el cáncer de próstata así como de garantizar el bienestar de los individuos aquejados de esta enfermedad.

4.1.3. Cuestionarios.

Los individuos participantes en el estudio, además de facilitar una muestra sanguínea, han contestado a una serie de preguntas personales realizadas por medio de una hoja de cuestionario (Anexo 2), común tanto a pacientes como a controles.

Todos los sujetos han sido informados de la finalidad del estudio y han dado su consentimiento explícito para participar en la investigación (Anexo 1). En el cuestionario se incluyen una serie de datos personales del individuo (fecha de nacimiento, altura, peso…), sus antecedentes familiares (lugar de procedencia, presencia de la enfermedad en individuos emparentados…), patologías diversas (AINES, ETS…) o hábitos relacionados con su estilo de vida. Esta información permite aplicar de forma eficaz los criterios de inclusión en el estudio y analizar la posible interacción de algunos de estos factores con el perfil genético en el desarrollo de la enfermedad. Concretamente, en este trabajo se han seleccionado aquellas variables para las cuales existe una base fundamentada que las relaciona con el riesgo de carcinoma prostático y que, además, son de fácil acceso: fecha de nacimiento, altura, peso y tabaquismo. Las características de la muestra según los parámetros de estudio (edad, *pack-years*, índice de masa corporal) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de estudio para casos y controles.

	CASOS (PCa)		CONTROLES	
	Media	Rango	Media	Rango
EDAD	64,79	50,00-84,00	66,09	49,00-91,00
TABAQUISMO (PY)	25,54	0,00-175,00	24,40	0,00-135,00
IMC	28,44	19,05-44,98	28,67	20,24-38,57

4.2. MUESTRA BIOLÓGICA.

Como muestra biológica para el estudio se ha utilizado sangre venosa total, extraída del área de la fosa cubital. Los tubos de vacío utilizados para su almacenamiento fueron tratados con anticoagulante y portaban una etiqueta identificativa del individuo en cuestión. El método de conservación de la muestra biológica ha sido la congelación a -18º C.

4.2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN a partir de sangre venosa se ha llevado a cabo indistintamente por medio de tres procedimientos: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989), kit de purificación *MasterPure* (*MasterPure™ DNA Purification Kit;* Epicentre, Illumina; Madison, EEUU) y kit *JetQuick* (*JetQuick® Genomic DNA Purification Kit;* Genomed GmbH; Löhne, Alemania). Una vez obtenido el ADN, se ha cuantificado su cantidad y pureza por medio de un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*NanoDrop^{TM} 1000 Spectrophotometer;* Thermo Fisher Scientific NanoDrop Products*;* Wilmington USA). Se ha considerado una pureza de calidad aceptable cuando el cociente 260/280 se encontraba en el rango 1,8-2,0 y el cociente 260/230 en el rango 1,8-2,2. Valores por encima o por debajo de estos rangos indican la presencia de proteínas (260/280) o de sustancias no proteicas (260/230).

4.2.1.1. Fenol-Cloroformo-Isoamílico.

En la extracción de ADN a partir del método del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se pueden diferenciar dos fases principales (Sambrook *et al*., 1989). En la primera de ellas se necesita liberar el ADN de su envoltura celular, para lo cual se procede al lisado de las células sanguíneas por agitación e incubación de las mismas en un tampón de lisis. A esta primera fase le sigue una incubación con proteinasa K, lo que permite degradar la fracción proteica asociada al ADN. En la segunda fase se procede a la purificación del ADN por medio del tratamiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Los grupos fosfato del ADN poseen tendencia hidrofílica, lo cual permite que éste quede disuelto en la fase acuosa, separándolo del resto de componentes celulares, como las proteínas o los lípidos, que quedarán disueltos en los solventes orgánicos (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico). Finalmente, el etanol provoca la precipitación del ADN, para que sea fácilmente recuperable y disuelto en agua estéril para su incubación y posterior conservación. El protocolo de extracción de ADN por medio del método de fenol-cloroforomo-acohol isoamílico se detalla a continuación:

<u>Fase 1: Lavado y lisado.</u>

1. Añadir 400 μl de sangre y 800 μl de agua destilada en un microtubo de 1,5 ml y mezclar por inversión.

2. Incubar 10 min a t^{a} ambiente.

3. Centrifugación a 16.060 g durante 5 min (microcentrífuga Biofuge-pico, Heraeus, Hanau Alemania).

4. Descartar el sobrenadante.

5. Añadir 1 ml de agua destilada y resuspender, si es necesario con ayuda del vórtex.

6. Centrifugar 5 min a 16.060 g y descartar el sobrenadante.

7. Añadir 450 μl de DBL (Tris-HCl a *p*H 7 y 1 M; EDTA-NaOH a *p*H 8 y 0,5 M; NaCl a 5 M) y 50 μl de SDS al 10% (10g en 100 ml).

8. Mezclar hasta disolver el pellet y dejar 1 hora en reposo, a tª ambiente.

9. Añadir 25 μl de proteinasa K (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a una concentración de 10 mg/ml.

10. Incubar a 56º C toda la noche o a 65º C durante 2 horas.

Fase 2: Fenol-cloroformo, purificación.

11. Sacar las muestras del baño y colocarlas 5 min en hielo picado.

12. Añadir 600 μl de fenol. Mezclar por inversión 40 veces.

13. Centrifugar 5 min a 16.060 g en microcentrífuga.

14. Extraer el sobrenadante y pasar a nuevos tubos de 1,5 ml.

15. Añadir 500 μl de cloroformo-isoamílico (24:1) y mezclar 40 veces.

16. Centrifugar 5 min a 16.060 g.

17. Extraer el sobrenadante a nuevos tubos, con especial cuidado de no arrastrar cloroformo.

18. Añadir 1 ml de etanol absoluto (conservado a -20º C) en cada tubo.

19. Dejar entre 15 y 30 min en el congelador, a -20º C.

20. Descongelar moviendo suavemente, ayudando a la precipitación del ADN.

21. Centrifugar a 16.060 g durante 5 min.

22. Vaciar el etanol tras decantación.

23. Eliminar los restos de etanol: 15 min los tubos boca abajo sobre papel limpio. Después en gradilla boca arriba se deja evaporar el etanol.

24. Resuspender el ADN en 100 μl de agua estéril. Mezclar muy suavemente, asegurándose que el ovillo se ha despegado de la pared.

25. Incubar a 56º C toda la noche.

26. Resuspender suavemente con la pipeta.

27. Conservar en el congelador (-20º C) para largos periodos o a 4º C si se va a utilizar a corto plazo.

4.2.1.2. *MasterPure*.

Como en el método anterior, la extracción de ADN por medio del kit *MasterPure* (*MasterPure™ DNA Purification Kit;* Epicentre, Illumina; Madison, EEUU) también consta de una primera fase de lisis celular. No obstante, la eliminación de las proteínas se realiza por medio de una desalinización (*desalting o salting out*) que las hace precipitar, seguida de una centrifugación que las separa del ADN contenido en el sobrenadante (Miller & Dykes, 1988). Como fase final, el ADN se precipita por medio de compuestos alcohólicos y se diluye en agua

estéril. Los pasos a seguir para la extracción por medio del kit *MasterPure* se detallan a continuación:

1. Añadir 200 μl de sangre en un tubo de 1,5 ml.

2. Añadir 600 μl de "*Red Cell Lysis Solution*". Invertir 3 veces para mezclar y golpear el fondo del tubo para resuspender cualquier resto.

3. Incubar a tª ambiente 5 min y agitar con el vórtex brevemente. Incubar otros 5 min seguidos de otra breve mezcla con el vórtex.

4. Centrifugar 1 min a 16.060 g.

5. Eliminar la mayoría del sobrenadante (dejar unos 25 μl de líquido). Resuspender el *pellet* con vórtex.

6. Añadir 300 μl de "*Tissue and Cell Lysis Solution*" pipeteando varias veces.

7. Colocar las muestras en hielo entre 3 y 5 min.

8. Añadir 175 μl de "*MPC Protein Precipitation Reagent*" a la muestra lisada y mezclar vigorosamente con el vórtex durante 10 s.

9. Centrifugar durante 10 min a 16.060 g.

10. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.

11. Añadir 500 μl de isopropanol. Invertir el tubo entre 30 y 40 veces.

12. Centrifugar durante 10 min a 16.060 g.

13. Eliminar el isopropanol con pipeta, con cuidado de no soltar el *pellet*.

14. Añadir 200 μl de etanol al 70%, con cuidado de no soltar el *pellet*. Eliminar el etanol con pipeta sin apurar demasiado. Repetir el lavado con otros 200 μl de etanol al 70% y centrifugar 1 min a 16.060 g antes de eliminar el etanol. En esta ocasión eliminar el máximo etanol posible sin arrastrar el *pellet*.

15. Dejar evaporar el etanol.

16. Resuspender el ADN en 70 μl de agua estéril.

17. Conservar en el congelador (-20º C) para largos periodos o a 4º C si se va a utilizar a corto plazo.

4.2.1.3. *JetQuick*.

El kit *JetQuick* (*JetQuick® Genomic DNA Purification Kit;* Genomed GmbH; Löhne, Alemania) emplea un sistema de purificación de ADN completamente distinto a los dos métodos anteriores, y se basa en el uso de columnas que contienen membranas de sílica.

El ADN se fija a dicha membrana con una alta afinidad tras la adición de un tampón de concentración salina y *p*H elevado. El resto de componentes celulares no presentan esta afinidad

por los silicatos, por lo que atraviesan fácilmente la membrana, permitiendo su separación del ADN. Los posibles polisacáridos y proteínas que quedaran atrapados en la membrana se eliminan por medio de lavados. Para la separación del ADN de la membrana de sílica se utilizan tampones de elución de baja concentración salina o por medio de agua estéril (Vogelstein & Gillespie, 1979). El protocolo de extracción por medio del sistema *JetQuick* se muestra a continuación:

1. Pipetear 200 μl de sangre total en un tubo de 1,5 ml.

2. Añadir 20 μl de proteasa GENOMED (20 mg/ml) y mezclar meticulosamente con vórtex o invirtiendo el tubo.

3. Añadir 200 μl del tampón K1 y mezclar.

4. Incubar durante 10 min a 58º C.

5. Añadir 200 μl de etanol absoluto (tª ambiente) y mezclar inmediata y meticulosamente para prevenir cualquier precipitación de ácidos nucleicos debida a las elevadas concentraciones de alcohol.

6. Montar una columna de micro-spin de *JetQuick* con un tubo receptor de 2 ml. Añadir la muestra a la columna de micro-spin sin humedecer el borde de la copa micro-spin y centrifugar la muestra durante 1 min a 10.000 g para que atraviese la membrana de sílice.

7. Descartar el líquido filtrado del tubo receptor, volver a montar la unidad micro-spin con el tubo receptor y lavar la columna de *JetQuick* aplicando 500 μl de tampón KX reconstituido con etanol y centrifugar durante 1 min a 10.000 g.

8. Descartar el líquido filtrado del tubo receptor, volver a montar la unidad micro-spin con el tubo receptor y lavar la columna *JetQuick* aplicando 500 μl de tampón K2 reconstituido con etanol y centrifugar durante 1 min a 10.000 g.

9. Descartar el líquido filtrado del tubo receptor, volver a montar el micro-spin y el tubo receptor y centrifugar el tubo vacío otra vez durante 1 min a 12.000 g para limpiar la membrana de sílice de cualquier líquido residual.

10. Descartar el tubo receptor e insertar el tubo micro-spin de *JetQuick* en un tubo nuevo de 1,5 ml, añadir 200 μl de agua precalentada a 70º C al centro de la membrana, incubar la columna durante 2 min a tª ambiente y centrifugar 2 min a 12.000 g.

El rendimiento de la extracción puede aumentar un 15% haciendo un segundo paso de elución de los 200 μl de ADN eluído.

El volumen del tampón de elución puede ser reducido a 100 μl si se desea obtener una mayor concentración de ADN.

11. Almacenar el ADN eluído en el microtubo de 1,5 ml. Conservar en el congelador (-20º C) para largos periodos o a 4º C si se va a utilizar a corto plazo.

4.3. GENOTIPADO.

Una vez extraído el ADN, se procedió al genotipado de las muestras mediante la tecnología de *MassArray Agena Bioscience* (*Sequenom*). Este procedimiento se ha llevado cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) y consta de dos reacciones. En primer lugar se amplifican los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés mediante una PCR *multiplex*. A continuación, estos amplicones se utilizan para llevar a cabo una reacción de discriminación alélica o extensión de cebadores (iPLEX® Gold).

En este procedimiento todas las reacciones terminan tras la extensión de una única base (*Single Base Extension*, SBE), motivo por el cual también se conoce como minisecuenciación. Los cebadores de extensión terminan justo antes del nucleótido que se pretende analizar, de modo que se incorporará un terminador de cadena ddNTP complementario al alelo del SNP que estamos analizando. La masa molecular de los productos de extensión dependerá del nucleótido añadido (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), lo cual permitirá distinguir la variante alélica correspondiente a la muestra a analizar. Esta diferencia de masa de los productos de la reacción de discriminación alélica es detectada por medio del sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF y los resultados son transferidos a un *software* informático para la visualización e interpretación de los resultados. A continuación se detalla el protocolo de genotipado (Oeth *et al*., 2005).

El primer paso en el proceso de genotipado es la preparación de las muestras de ADN en placas de 96 pocillos.

Dependiendo de la concentración de cada muestra, será necesario hacer una dilución de la misma para adaptarse a los requisitos de concentración de ADN del propio genotipado. Seis de los pocillos de cada placa se entregan vacíos en el servicio de genotipado porque se utilizan con muestras control (Fig. 64). Tres de ellos funcionarán como controles negativos y consisten en muestras que no contienen ADN para comprobar que no existe contaminación. Los tres restantes se usarán como controles positivos, siendo muestras de individuos cuyo genotipo es conocido y que presentan un parentesco de primer grado, es decir un trío familiar (padre, madre e hijo). Se introducen, además, tres muestras duplicadas en cada placa para reforzar el control de calidad de los resultados.

Customer: JLBC
Plate: 1
Date: 15 junio 2015
Sample concentration: 40 ng/µl
Volume: 40 µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	empty
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	empty
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	empty
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	empty
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	empty
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	empty

Figura 64. Plantilla de genotipado.

Como la tecnología *multiplex* permite el genotipado conjunto de hasta 36 SNPs o INDELs por ensayo, será necesario en primer lugar llevar a cabo un diseño de cebadores compatibles para la misma reacción. Se generan ensayos con los SNPs escogidos por el usuario por medio de un *software* de diseño propio o con paneles comerciales de *Agena* (*Sequenom*). Los SNPs se clasifican por prioridad en función del interés en nuestro estudio y se valoran sus propiedades (frecuencia polimórfica en población europea, exclusión de SNPs no validados, artefactos…).

A continuación se procede al diseño de cebadores para la PCR *Multiplex* correspondientes a la región genómica de cada SNP, tanto *Forward* como *Reverse*. Puesto que se incluirá un elevado número de pares de cebadores en cada reacción, éstos deben cumplir una serie de requisitos: presentar una longitud específica, un contenido de CG parecido, una temperatura de hibridación y de fusión similar, así como evitar la formación de dímeros entre ellos o la amplificación inespecífica con otras regiones del genoma no deseadas. Para poder cumplir estos requisitos, los SNPs se agrupan en reacciones compatibles, para lo cual es posible que deban realizarse varios diseños hasta encontrar un punto en el que se equilibren las propias necesidades del usuario y las compatibilidades reales de los SNPs.

Una vez realizado el diseño, se procede con la PCR *Multiplex* para amplificar los *loci* en los que se encuentran los SNPs a estudiar. Esta reacción se lleva a cabo en una sala de pre-PCR perfectamente aislada donde no existe ADN ni ARN amplificado para evitar posibles contaminaciones.

El primer paso en la amplificación es la transferencia de las muestras de las placas de 96 pocillos a placas de 384 pocillos. Se dispensan 2 μl de ADN de cada muestra en cada pocillo mediante el robot de puntas fijas *Tecan Freedom Evo*. Las posiciones de los controles de calidad del CeGen, tanto positivos como negativos, se marcan en la parte inferior de la placa. A continuación, ya en las nuevas placas, se le añade la mezcla de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para la amplificación de ADN (Tabla 4). Esta mezcla se prepara con los reactivos correspondientes a la tecnología *Agena Bioscience* (*Sequenom*). En primer lugar, se hace una mezcla con los cebadores correspondientes a cada marcador (F y R). Para que los cebadores actúen de manera eficaz conjuntamente se diluyen a una concentración de 10X a partir de una concentración de 100X y se añaden a la mezcla de PCR. Dicha mezcla se dispensa con un volumen fijo de 3 μl por pocillo mediante el robot *Biomek NX*. Una vez introducidos el ADN y la mezcla de PCR en los pocillos, se somete a la placa a un vórtex y un *spin* mediante la centrifugadora *Centrifuge* 5810.

Tabla 4. Cantidades y componentes de la mezcla de PCR.

Reactivos	Concentración en 5 μl	Volumen (1 reacción)	Volumen (384 reacciones)*
H_2O Nanopura	NA	1,850 μl	888 μl
Tampón PCR (10X)	1,25X	0,625 μl	300 μl
$MgCl_2$ (25 mM)	1,625 mM	0,325 μl	156 μl
Mezcla dNTP (25 mM)**	500 mM	0,100 μl	48 μl
Mezcla cebadores (500 nM de cada uno)	100 nM	1,000 μl	480 μl
ADN (5-10 ng/ μl)	5-10 ng/reacción	1,000 μl	480 μl
Hotstar Taq® (5U/ μl)	0,5 U/reacción	0,100 μl	48 μl
Total		5,000 μl	2400 μl

**Volúmenes incluyen un 25% de excedente.*
***No más de 5 ciclos de descongelación*

El servicio de genotipado del CeGen utiliza un programa de termociclado fijo, el cual se detalla a continuación:

- 94 ºC 15 min
- 94 ºC 20 s
- 56 ºC 30 s } 45 ciclos
- 72 ºC 1 min
- 72 ºC 3 min
- 4 ºC ∞

Tras la PCR, se realiza un tratamiento SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase)* para la eliminación de los grupos fosfato, mediante una desfosforilación de los dNTPs no incorporados, que podrían interferir en la reacción de extensión, transformándolos en dNMPs. Para ello se realiza una mezcla con los componentes y las cantidades indicadas en la Tabla 5. Se añaden 2 μl de la mezcla en cada 5 μl de la reacción de PCR. Las placas se agitan brevemente con vórtex, se centrifugan suavemente y se introducen en el termociclador.

Tabla 5. Mezcla de SAP.

Reactivos	Volumen (2 reacción)	Volumen (384 reacciones)*
H_2O Nanopura	1,530 μl	734,4 μl
Tampón SAP 10X	0,170 μl	81,6 μl
Enzima SAP (10U/ µl)	0,300 μl	144,0 μl
Total	2,000 μl	960,0 μl

**Los volúmenes incluyen un 25% de excedente.*

El programa de SAP es el siguiente:

- 37 ºC 20 min
- 85 ºC 50 min
- 4 ºC ∞

A continuación se lleva a cabo un diseño de los *primers* de extensión, cuya masa permitirá distinguir un marcador de otro. Los cebadores de extensión se configuran de tal manera que sean de tamaño progresivamente ascendente, para que los picos resultantes del análisis con MALDI-TOF no se solapen. Esto se realiza añadiendo colas polinucleotídicas para aumentar la masa, aunque con un tamaño de cebador elevado se produce un aumento acumulativo de ruido de fondo que puede complicar la lectura de los genotipos. Para solventar este problema se utiliza mayor concentración de los cebadores de extensión cuanto mayor es la masa de cada uno de ellos. El método general para ajustar la extensión de los cebadores es dividirlos en grupos de mayor masa y en grupos de menor masa. Todos los cebadores incluidos en el grupo de masa elevada presentan el doble de concentración con respecto al grupo de menor masa.

La reacción iPLEX (*increased Plexing Efficiency and Flexibility*) es el siguiente paso en el proceso de genotipado. En este procedimiento se lleva a cabo la extensión de los cebadores, los cuales hibridan con la región complementaria del amplicón y terminan justo antes de la base que se pretende analizar.

Para cada polimorfismo se diseñará solo un cebador *Forward* o solo un cebador *Reverse*. El cebador es extendido gracias a la actuación de la enzima *Termosequenasa* y a terminadores de cadena ddNTPs, uno de los cuales se incorporará al cebador y se unirá de manera complementaria a la cadena molde, identificando la variante del SNP. Las distintas bases nitrogenadas presentan distinta masa molecular (A=313,0576 amu; G=329,0526 amu; C=289,0464 amu; T=304,0461 amu) con lo que dotan de distinta masa a los productos de extensión. Por lo tanto, esta diferencia de masa de los productos de extensión es la que permite identificar los alelos de un SNP. El procedimiento se conoce como *Single Base Extension* (SBE) o minisecuenciación porque determina la identidad de una base nucleotídica en una posición concreta del ADN (Fig. 66). Para llevar a cabo la reacción iPLEX se mezclan los reactivos bajo las condiciones indicadas en la Tabla 6, seguido de un vórtex y una breve centrifugación final.

Tabla 6. Mezcla iPLEX.

Reactivos	Concentración en 9 μl	Volumen (1 reacción)	Volumen (384 reacciones)**
H_2O Nanopura	NA	0,755 μl	362,40 μl
Tampón iPLEX (10X)	0,222X	0,200 μl	96,00 μl
Mezcla extensión iPLEX	1X	0,200 μl	96,00 μl
Mezcla cebadores (7 μM:14 µM)*	0,625 µM:1,25 µM	0,804 μl	385,92 μl
Enzima iPLEX	1X	0,041 μl	19,68 μl
Total		2,000 μl	960,00 μl

**Ambas cantidades ilustran la concentración duplicada de los cebadores de elevada masa respecto a los de baja masa.*
***Los volúmenes incluyen un 25% de excedente.*

Se lleva a cabo la reacción en un termociclador usando el siguiente programa:

- 94 ºC 30 s
- 94 ºC 5 s
- 52 ºC 5 s } 40 ciclos } 5 ciclos
- 80 ºC 5 s
- 72 ºC 3 min
- 4 ºC ∞

Una vez terminada esta reacción es necesario un segundo proceso de purificación, en una sala de post-PCR. Dicho proceso se lleva a cabo con resinas para eliminar las sales que se generan en la reacción de PCR procedentes de tampones o del cloruro de magnesio. Si no se eliminan totalmente, las sales generan ruido y la línea de fondo de los resultados de la espectrometría posterior aumenta demasiado de altura, lo que dificulta la detección de algunos picos y produce resultados poco fiables (falsos positivos, picos no detectados, ruido de fondo…).

Para realizar este proceso de purificación se añaden 15 μl de agua miliQ para cada muestra, dispensada por otro robot (*NX*, *Beckman Coulter*). Después se añaden 6 mg de resina húmeda en cada pocillo de una placa de 384, para luego unirla a la placa de genotipado. Se pone en agitación en el robot *Roto Shake Genie* durante 20 min para que se mezcle homogéneamente la resina con el agua y la muestra. A continuación se centrifuga la placa (3.000 rpm, 5 min) para que la resina, junto con las sales que arrastra, se deposite en el fondo del pocillo.

La fase siguiente es la dispensación de 15 nl de las muestras a un microchip denominado *SpectroCHIP® Bioarrays* por medio de un nanodispensador (*MassARRAY Nanodispenser*). La deposición de resina en el fondo del pocillo favorece que el robot dispensador pueda pipetear la muestra sin tocar la resina ni contaminar las puntas con ella.

Cada microchip consiste en una placa de 384 micropocillos más diez posiciones adicionales para controles de calibrado. En primer lugar el robot lleva a cabo un proceso de desinfección y empieza punteando los 10 pocillos correspondientes a las muestras de calibración, para continuar punteando las muestras de 24 en 24 pocillos. Estos pequeños chips son los que se utilizan en el proceso de MALDI-TOF, que se explica a continuación y aparece ilustrado en la Fig. 65:

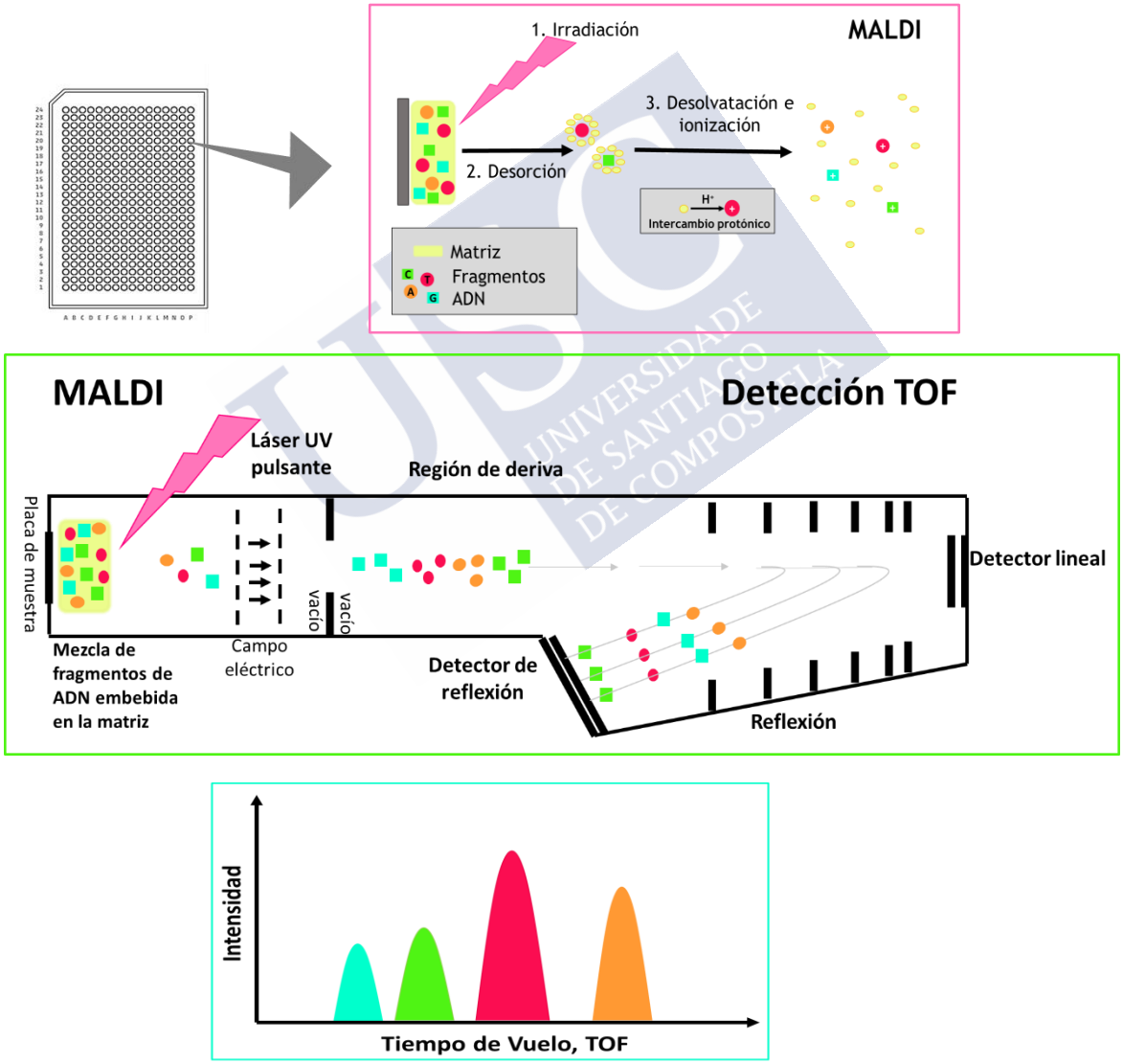

Figura 65. Esquema de MALDI-TOF.

El procedimiento de Espectrometría de Masas llevado a cabo por el *masARRAY Analyzer* consta de dos etapas. En la primera de ellas (MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*), el ADN incorporado a la matriz del microchip es sometido a una etapa de desorción-ionización por medio de un bombardeo láser pulsante de baja intensidad. Se forma entonces una micronube de iones de la propia matriz en la cual el ADN va a estar excitado, permitiendo la separación molecular. El grado de excitación varía según la secuencia nucleotídica que presente cada fragmento de ADN, pudiendose distinguir secuencias que se diferencian en un solo nucleótido, como es el caso de los SNPs.

A continuación los iones se aceleran por medio de un campo magnético, en el que las diferentes moléculas de ADN van a migrar a distinta velocidad a través de una columna de vacío dependiendo de la magnitud de la excitación. Los iones cuentan con diferente relación carga/masa, de modo que los de mayor masa volarán más lentamente que los de menor masa y los de mayor carga más rápidamente que los de menor carga. En la segunda etapa, estos iones pasan por un detector (TOF: *Time Of Flight*), que registra el tiempo de vuelo, asociándole a cada uno de ellos un cociente masa-carga. La migración diferencial de los fragmentos quedará registrado por medio de un sistema de picos acoplado al detector. La longitud de los cebadores indicará una masa diferencial que permitirá identificar los picos de cada SNP y la extensión del cebador con uno de los cuatro ddNTPs también dotará de distinta masa a los productos de extensión, lo cual permitirá identificar los alelos del SNP (Fig. 66). Con este procedimiento en formato biochip se puede hacer el análisis simultáneo de múltiples SNPs de diferentes genotipos.

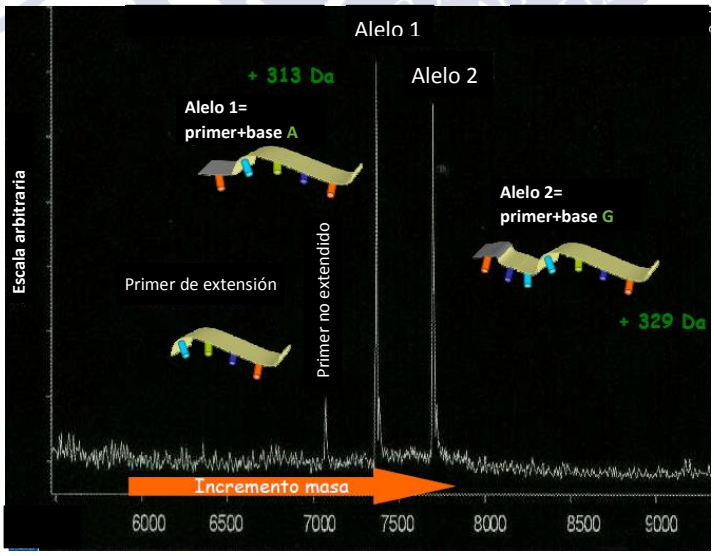

Figura 66. Visualización por MALDI-TOF de la reacción de extensión de *primers*. La diferencia de masa de los productos de extensión permite identificar los alelos.

Los datos generados en el espectrómetro de masas se transfieren a un ordenador en el cual se analizan los resultados en tiempo real por medio del *software TyperAnalyzer* v.4.0.22. (Figura 67). Éste realiza un doble barrido de la muestra para identificar el chip con la base de datos introducida y lleva a cabo un ajuste de la línea de fondo del espectro. En la Figura 67 se observa uno de los pocillos del microchip (izquierda) así como el espectro correspondiente

(derecha) con los picos para todos los SNPs que se estudian en el ensayo. Los 10 primeros pocillos permiten hacer un calibrado, marcando los picos máximos y mínimos. La ausencia de picos indica una PCR fallida y una línea de fondo que absorbe las crestas de los genotipos es síntoma de que las sales no se han eliminado correctamente. A medida que se realiza el análisis, el *software* va marcando cada una de las muestras en la imagen de la placa con un código de colores: en verde se muestran los pocillos con resultado positivo, con círculos rojos los resultados negativos y con rombos rojos los controles negativos.

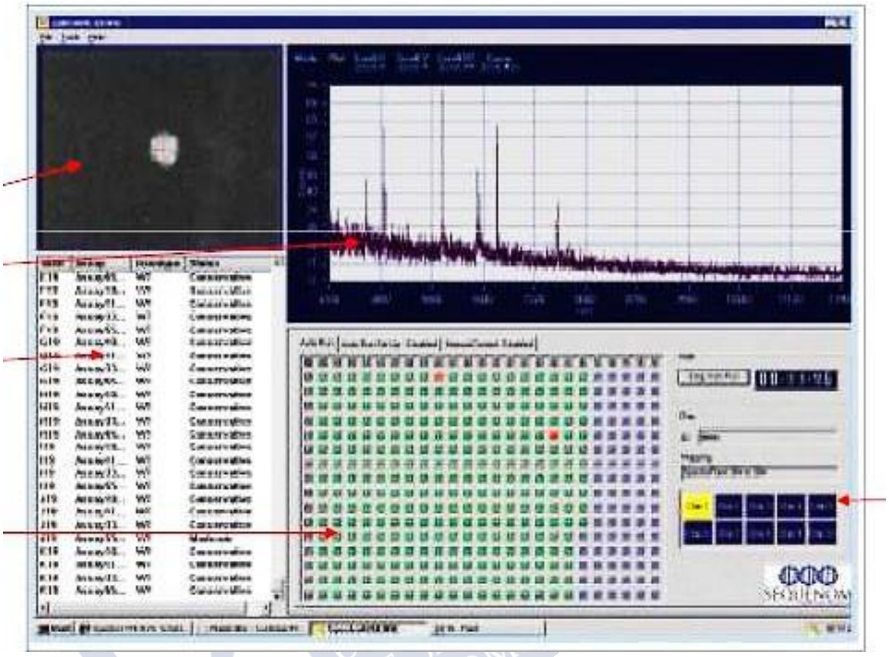

Figura 67. Visualización de los resultados obtenidos en el espectrómetro de masas mediante el *software TyperAnalyzer* v.4.0.22.

Una vez terminado el análisis en tiempo real, los resultados se transfieren a una base de datos a partir de la cual se realiza un análisis manual (Fig. 68). Se observa una representación de la placa genotipada: en verde oscuro las muestras que han obtenido resultados con casi el total de marcadores genotipados claramente, en verde más claro las muestras que han obtenido resultados con algún genotipo no identificado claramente, en amarillo los resultados dudosos y que hay que revisar y en rojo están aquellas muestras para los que el *software* no ha podido asignar genotipo para los distintos marcadores, ya sea por error en la amplificación o porque los resultados obtenidos no están claros. Dentro de los individuos que aparecen marcados en rojo tienen que estar todos los que se han usado como control negativo, indicando que no hay contaminación.

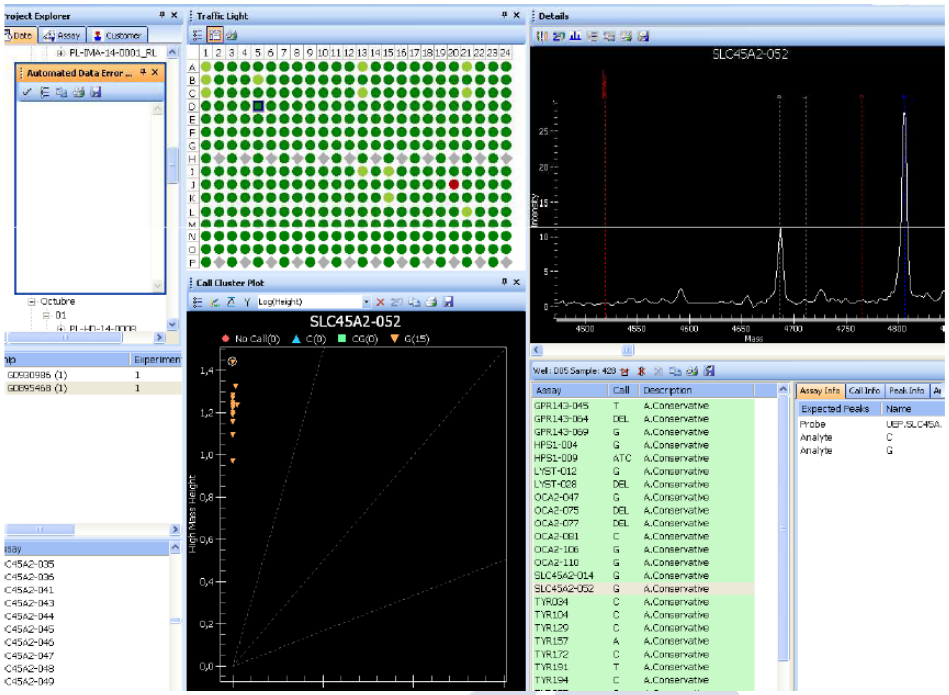

Figura 68. Salida del programa informático para el análisis manual del genotipado.

Para llevar a cabo la revisión manual del genotipado se marca cada pocillo individualmente, observándose cada uno de los *rs* analizados. La lista de marcadores se muestra en el cuadro de la parte inferior derecha de la imagen mientras que la representación gráfica se encuentra arriba a la derecha.

Un ensayo completo mostraría una imagen semejante a la Fig. 69A. Se puede ver la distribución de todos los individuos para cada uno de los *rs* analizados. Dentro de las distintas opciones de visualizado se encuentra la de *clúster* (Fig. 69B). Esta opción permite ir comprobando el genotipo de cada individuo para cada uno de los *rs* de forma independiente mediante la obtención de tres líneas que delimitan los genotipos presentes.

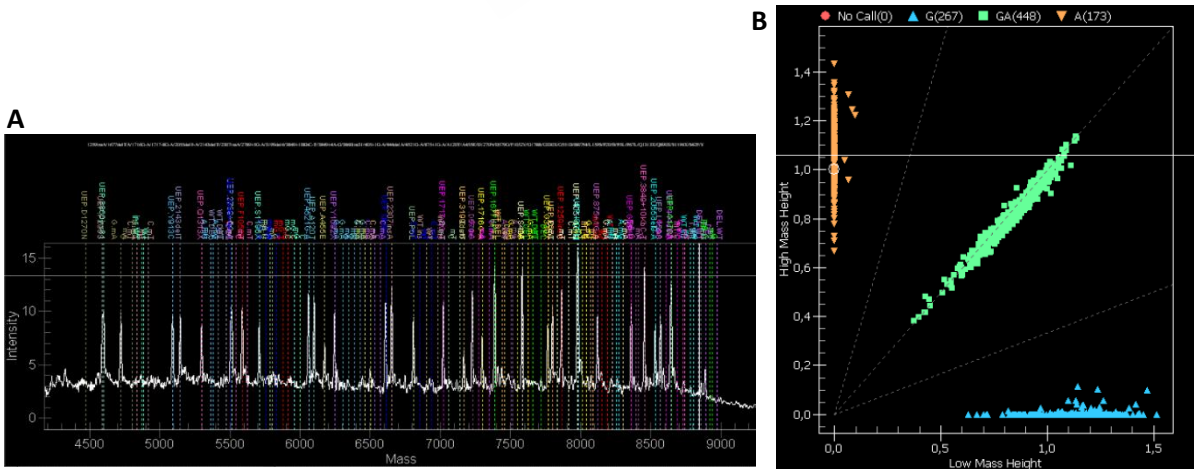

Figura 69. Detalles de la salida para el análisis manual del genotipado. A. Picos obtenidos para un ensayo completo. B. Visión de resultados de un *clúster* con cada uno de los genotipos perfectamente marcados.

Otra de las opciones es la revisión manual de los espectros, en los que un pico en una posición representa un individuo homocigoto, un pico en una posición distinta de la anterior representaría el otro homocigoto y la obtención de dos picos con la mitad de altura que los homocigotos estaría refiriendo un individuo heterocigoto para ese SNP (Fig. 70).

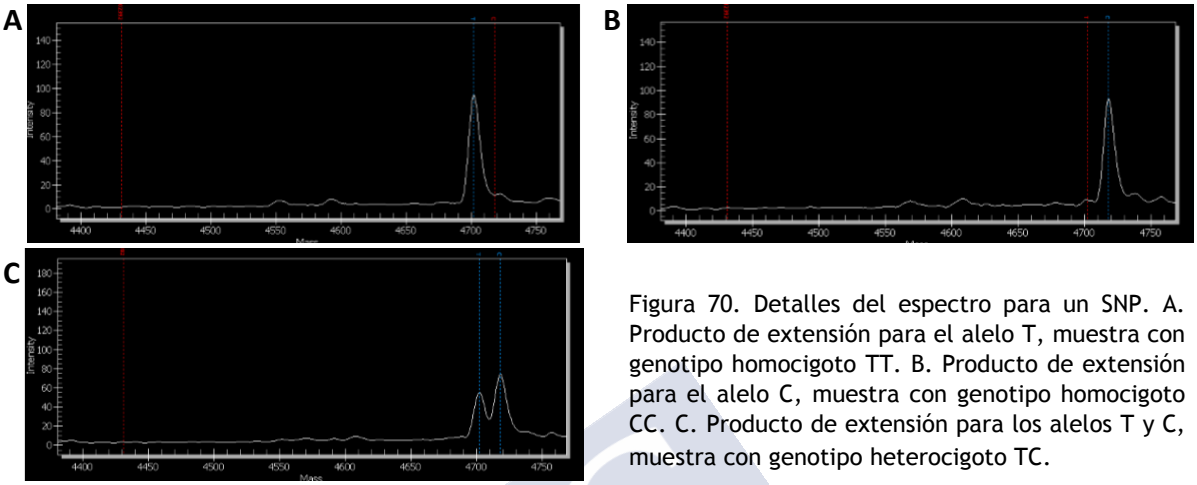

Figura 70. Detalles del espectro para un SNP. A. Producto de extensión para el alelo T, muestra con genotipo homocigoto TT. B. Producto de extensión para el alelo C, muestra con genotipo homocigoto CC. C. Producto de extensión para los alelos T y C, muestra con genotipo heterocigoto TC.

Por último, se lleva a cabo un control de calidad en el que se comprueban las muestras replicadas en placas e interplacas, así como el trío de controles positivos (muestras CEPH; C*oriell Institute*) y negativos presentes en cada placa.

Para la presente tesis doctoral se han genotipado los polimorfismos que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Lista de marcadores que se han incluido en la tesis doctoral.

PROTEÍNA	GEN	POLIMORFISMO		
Caspasa 3	*CASP3*	rs1049216	rs2705897	rs4647603
Caspasa 7	*CASP7*		rs11196418	
Caspasa 8	*CASP8*		rs1045485	
Caspasa 9	*CASP9*		rs1052576	
Receptor Fas	*FAS*	rs1800682	rs3740286	rs10509561
Ligando Fas	*FASLG*		rs763110	
Bcl-2	*BCL2*		rs2279115	
p53	*TP53*		rs1042522	
MDM2	*MDM2*	rs2279744	rs937283	
Survivina	*BIRC5*	rs9904341	rs8073069	
p21	*CDKN1A*		rs2395655	
p27	*CDKN1B*	rs2066827	rs34330	

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

4.4.1. Frecuencias alélicas y genotípicas.

En primer lugar se lleva a cabo el cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de casos y en el de controles, lo cual permite un primer acercamiento al perfil genético de la muestra. Todos los polimorfismos incluidos son *loci* autosómicos dialélicos, por lo que en este apartado nos referiremos genéricamente a ambos alelos como A y a.

Las frecuencias genotípicas observadas absolutas se han obtenido mediante un simple recuento de genotipos. A partir de ellas se han calculado las frecuencias alélicas observadas, absolutas (*f*) y relativas (*fr*), siendo *n* el número total de casos o de controles. Para cada alelo se ha calculado el error estándar (s.e.). Las fórmulas utilizadas se muestran a continuación:

$$f(A) = 2(AA) + Aa$$
$$f(a) = 2(aa) + Aa$$

$$f_r(A) = p = \frac{f(A)}{2n} = \frac{2(AA) + Aa}{2n}$$
$$f_r(a) = q = \frac{f(a)}{2n} = \frac{2(aa) + Aa}{2n}$$

$$s.e. = \sqrt{p(1-p)/2n}$$
$$s.e. = \sqrt{q(1-q)/2n}$$

4.4.2. Análisis de equilibrio genético.

El siguiente paso en el análisis es comprobar si la distribución alélica de un marcador genético en una población concreta se ajusta a los supuestos asumidos por el equilibrio *Hardy-Weinberg* o equilibrio genético, esto es, la no incidencia de los diversos factores evolutivos en la distribución de las frecuencias genotípicas en la población.

En un estudio de tipo caso-control la valoración del equilibrio genético se realiza solo en los controles, ya que se espera que su distribución para cada uno de los marcadores estudiados sea comparable a la de la población general. El análisis del equilibrio genético no se lleva a cabo en los casos porque se espera que haya una sobreestimación del alelo/genotipo de riesgo asociado con el desarrollo de la enfermedad de estudio, respecto a la frecuencia existente en la población general. La existencia de desequilibrio genético para un marcador podría sesgar estadísticamente posibles asociaciones entre un determinado genotipo o alelo y la enfermedad.

La evaluación del equilibrio genético se realiza mediante un test de bondad de ajuste, como es el estadístico χ^2, a partir de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y las esperadas en condiciones de equilibrio genético:

$$\chi^2 = \sum \frac{(observadas - esperadas)^2}{esperadas}$$

Las frecuencias absolutas observadas representan el recuento de cada genotipo en el grupo de casos y controles, mientras que las frecuencias esperadas se calculan de la siguiente manera:

$$fe(AA) = p^2 n \qquad fe(Aa) = 2pqn \qquad fe(aa) = q^2 n$$

En este test se ha aplicado un nivel de significación (α) igual a 0,05, siendo los grados de libertad (g.l.) el número de clases genotípicas menos el número de alelos. Todos los marcadores analizados son dialélicos con tres genotipos posibles, por lo tanto, para todos los análisis realizados los grados de libertad es 1.

$$g.l. = nº\ clases\ genotípicas - nº\ alelos = 3 - 2$$

$$g.l. = 1$$

En este análisis se parte de una hipótesis nula, según la cual la población de controles se encuentra en equilibrio genético para un marcador concreto. Cuando el valor de probabilidad (p) asociado al valor de χ^2 es superior a 0,05 no se puede rechazar la hipótesis nula, y por lo tanto se asume una situación de equilibrio genético en la población estudiada para un marcador específico.

4.4.3. Índice de heterocigosidad.

El índice de heterocigosidad (h) es la frecuencia de individuos heterocigotos en cada *locus* y permite valorar el grado de polimorfismo (Ayala & Kiger, 1984). Estima la probabilidad de que, en un *locus*, cualquier par de alelos escogidos al azar sean diferentes entre sí. Para un *locus* dialélico:

$$h = 1 - \sum pi^2 = 1 - (p^2 + q^2)$$

Para tener en cuenta el tamaño muestral, Nei y Roychoudhury (1974) desarrollaron una corrección para estimar la heterocigosidad esperada insesgada ($\hat{h}$).

$$\hat{h} = 2n[1 - \sum (pi)^2]/2n - 1$$

4.4.4. Estadístico t_s.

El estadístico t_s (Sokal & Rohlf, 1969), es un test de significación de diferencias entre dos porcentajes y se ha utilizado para valorar si se observan diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de casos y controles para cada uno de los dos alelos de cada marcador.

$$t_s = \frac{arc.sen\sqrt{p_1} - arc.sen\sqrt{p_2}}{\sqrt{820{,}8(\frac{1}{2n_1} + \frac{1}{2n_2})}}$$

Siendo:

p_1 y p_2 las frecuencias relativas del alelo A en las poblaciones 1 (casos) y 2 (controles) respectivamente y $2n_1$, $2n_2$ el número total de alelos muestreados en las poblaciones 1 y 2 respectivamente.

Para obtener la probabilidad asociada a este t_s se compara con los valores de una tabla de áreas de una curva normal (nivel de significación, α= 0,05), doblando la probabilidad ya que se trata de un test de dos colas.

4.4.5. Cálculo de riesgo relativo.

En los ensayos clínicos se pueden utilizar varias medidas de asociación para evaluar los resultados obtenidos, entre las cuales se encuentran el riesgo relativo (RR) y el *Odds Ratio* (OR). Ambas pueden usarse en los estudios de cohorte prospectivos, en los cuales un grupo de individuos de la misma población, expuestos y no expuestos a un factor de riesgo, son sometidos a un seguimiento para evaluar en cuales se desarrolla el suceso de interés. Cuando la proporción del suceso es baja, las dos medidas aportan resultados equivalentes, pero a medida que su frecuencia aumenta, se acentúan las diferencias entre ellas, ofreciendo el OR una sobreestima del RR. La posibilidad de poder ajustar los resultados para variables confusoras es una de las razones de la utilización de los OR en estudios de cohortes o en pruebas clínicas aleatorias. Sin embargo, existen estrategias alternativas para ajustar el riesgo relativo (RR), tales como el método de Mantel-Haenszel, regresión log-binomial, entre otras (Knol, 2012).

En los estudios de caso-control no es posible estimar los RR directamente porque la prevalencia del suceso adverso no se suele conocer, ya que la relación numérica entre casos y controles es definida por el investigador una vez que el suceso ya ha ocurrido. Por lo tanto, en este tipo de estudios retrospectivos, el riesgo a padecer una enfermedad asociado con poseer alguna característica, como un genotipo concreto, se evalúa mediante el cálculo de *Odds Ratio* (Clarke *et al*., 2011; Deeks, 1998; Sackett, Deeks, & Atman, 1996). Esta será la medida de asociación que se utilizará en la presente tesis doctoral para valorar la influencia del genotipo y otras variables de interés en el desarrollo del cáncer de próstata.

4.4.5.1. *Odds Ratio*.

El cálculo del *Odds Ratio* se realiza por medio de una tabla de contingencia de 2x2, en la que se analizan dos grupos de individuos: aquellos en los que ocurre un determinado suceso, generalmente una enfermedad, y aquellos en los que no.

Para ambos grupos se estima la proporción de individuos que estuvieron expuestos o no a un determinado factor de riesgo. En nuestro caso, el *Odds Ratio* relaciona la probabilidad de que se desarrolle cáncer de próstata en los individuos portadores de un genotipo(s) frente a la probabilidad de que esto ocurra en portadores de otro genotipo(s) (Tabla 8). Esto nos proporciona un valor numérico que oscila entre 0 e ∞, y que se interpreta en términos de la magnitud del riesgo que presentan los individuos portadores de un determinado genotipo(s) de desarrollar PCa en comparación a los portadores de otro genotipo(s).

Cuando el OR tiene un valor de 1 indica que la probabilidad de desarrollar PCa es la misma, independientemente de los genotipos comparados, esto es, indica la ausencia de asociación entre ambas variables. Si su valor es superior a 1, la asociación es positiva, es decir, la presencia de un determinado genotipo(s) se considera un factor de riesgo para el desarrollo del PCa. Por el contrario, un valor inferior a 1 indica una asociación negativa, considerándose el genotipo(s) como un factor protector (Tabla 9).

Tabla 8. Descripción de OR mediante una tabla de contingencia.

	Casos (PCa)	Controles (No PCa)	
Genotipo A	a	b	Individuos con genotipo A (expuestos a factor)
Genotipo B	c	d	Individuos con genotipo B (no expuestos a factor)
	Total de Casos	Total de NO Casos	n (total)

$$OR = \frac{a/b}{c/d} = \frac{Probabilidad\ de\ PCa\ en\ genotipo\ A}{Probablidad\ de\ PCa\ en\ genotipo\ B}$$

Tabla 9. Interpretación de los resultados del cálculo de OR.

Valor de OR	Tipo de asociación	Efecto biológico
OR > 1	Asociación positiva	Factor de riesgo
OR = 1	No asociación	Indiferente
OR < 1	Asociación negativa	Factor protector

Además del cálculo de valores de *Odds Ratio* brutos, también se ha llevado a cabo el cálculo de OR ajustados por edad, tomando ésta como una variable cuantitativa. Este análisis permite evitar la posible influencia de la edad como una variable confusora. El procedimiento se ha realizado gracias al *software* SPSS, utilizando regresión logística binaria.

4.4.5.1.1. *Modelos genéticos.*

Los estudios de tipo caso-control, generalmente, consideran dos grupos de estudio: tratamiento/control o expuesto/no expuesto. No obstante, en los estudios de asociación genética se presentan un mínimo de tres grupos, correspondientes con los tres genotipos posibles de un marcador dialélico. Deben, por tanto, ser agrupados para su comparación de manera que reflejen la forma en que los diferentes genotipos afectan al riesgo de desarrollar la enfermedad.

Esta dicotomización de los tres grupos se realiza aplicando diferentes modelos genéticos que tratan de plasmar la naturaleza de la relación genotipo-carcinogénesis prostática (Attia, Thakkinstian, & D'Este, 2003; Dorak, 2017; Horita & Kaneko, 2015; Lewis & Knight, 2012).

- Modelo dominante:

En el modelo dominante se explora el impacto de la variante alélica de riesgo asumiendo que, independientemente de que esté en homocigosis o heterocigosis, conlleva a un riesgo diferencial frente a la variante alélica protectiva. Esto significa que, aunque el heterocigoto (Aa) es portador de ambas variantes alélicas (riesgo/protección) el efecto dominante de la variante de riesgo anula el carácter protectivo que pudiera compensar la otra variante alélica en esta clase genotípica.

Si en un *locus* con dos alelos, A y a, encontramos que el alelo a manifiesta un efecto de riesgo, en el modelo dominante la presencia de una única copia de este alelo determina la existencia de dos genotipos asociados a un riesgo equivalente (en este caso aa y Aa) frente a un genotipo de riesgo diferente (AA). Por lo tanto, en el modelo dominante, los dos genotipos portadores del alelo de riesgo (aa+Aa) son relativizados frente al homocigoto protectivo (aa).

$$OR = (Aa + aa)\ \ vs.\ AA$$

- Modelo recesivo**.**

Por el contrario, en el modelo recesivo, el efecto de la variante de riesgo solamente se manifiesta si el individuo no es portador de la variante alélica protectiva. En otras palabras, el carácter de riesgo se va a manifestar únicamente en los genotipos carentes (no portadores) del alelo protectivo, es decir, homocigotos para el alelo de riesgo. Es decir, en los heterocigotos (Aa) es suficiente la presencia del alelo protectivo para conferir globalmente a este genotipo dicho carácter.

Por lo tanto, este modelo permite analizar la asociación genética relacionada con un alelo de riesgo recesivo. En el caso de encontrar un alelo a de riesgo, la presencia de una única copia del alelo protectivo (en este caso A) determina la existencia de dos genotipos asociados a un

efecto equivalente (AA y Aa), frente a un genotipo de riesgo diferente (aa). Por lo tanto, en el modelo recesivo el genotipo homocigoto portador del alelo de riesgo (aa) es relativizado frente a los dos genotipos portadores del alelo protectivo (Aa+AA).

$$OR = aa \ \ vs. \ (Aa + AA)$$

- Modelo sobredominante.

En el modelo sobredominante la manifestación del impacto/protección se puede reflejar de manera más fuerte en los individuos heterocigotos (Aa). Es decir, la expresión celular de los heterocigotos conduce a que en dicho entorno celular existan dos variantes proteicas, producto de ambos alelos, que pueden tener efectos independientes. O bien un efecto compensatorio, es decir, las deficiencias funcionales de una variante son compensadas por la secuencia aminoacídica de la otra; o por el contrario, un carácter potenciador del riesgo, tras la consideración conjunta de la disfuncionalidad parcial de una u otra variante. Por lo tanto, los genotipos homocigotos (AA y aa) presentarían un riesgo equivalente, frente a un riesgo diferente asociado al heterocigoto (Aa).

$$OR = (AA + aa) \ \ vs. \ Aa \qquad\qquad OR = Aa \ \ vs. \ (AA + aa)$$

- Modelo codominante.

En el modelo codominante se establece una valoración relativa del impacto de los diferentes genotipos entre sí. Se toma como referencia uno de los dos genotipos homocigotos, asignándole el valor de 1, y se valora comparativamente el impacto (riesgo/protección) de las otras dos clases genotípicas en relación a este genotipo.

Alternativamente, puede realizarse el cálculo por separado de cada una de las tres comparaciones posibles de los genotipos entre sí. Como ya hemos visto, dicho carácter puede depender del modo de expresión génica, de ahí que lo que se aborda es el análisis de las diferentes combinaciones genotípicas.

$$OR = AA \ \ vs. \ Aa \qquad\qquad OR = AA \ \ vs. \ aa \qquad\qquad OR = Aa \ \ vs. \ aa$$

- Modelo alélico.

Si bien los modelos anteriores pueden conferir a los heterocigotos un papel de compensación de la funcionalidad biológica de ambas variantes, en el modelo alélico esta consideración queda obviada. De ahí que en esta estrategia analítica, el cómputo final de cada variante alélica (A, a) se establece al margen de si tal valor total proviene del recuento de las dos clases homocigóticas o heterocigóticas. En este caso los OR se calculan utilizando las frecuencias absolutas de cada alelo en casos y controles.

$$OR = A \ vs. \ a \qquad\qquad OR = a \ vs. \ A$$

Siendo: $A = 2AA + Aa$ y $a = 2aa + Aa$

De todas maneras, hay que tener en cuenta que estos modelos fueron originalmente desarrollados para el análisis de enfermedades de herencia mendeliana simple y, por lo tanto, pueden resultar demasiado sencillos para el estudio de enfermedades complejas influenciadas por la variación en múltiples *loci* (García-Closas, Jacobs, Kraft, & Chatterjee, 2011).

4.4.5.2. Cálculo de la significación estadística.

Para evaluar la posibilidad de que el valor de OR se encuentre determinado por el azar se han aplicado dos métodos estadísticos: los intervalos de confianza al 95% y el test de χ^2.

4.4.5.2.1. *Intervalos de Confianza (95%).*

Existe una relación inversa entre el intervalo de confianza y el tamaño muestral, de modo que cuanto mayor sea el número de individuos menos amplio será el intervalo. Se considera una asociación estadísticamente significativa cuando el intervalo de confianza no incluye a la unidad, es decir, se obtienen valores superiores o inferiores a 1. El cálculo de IC al 95% se ha llevado a cabo usando la siguiente fórmula:

$$IC = OR^{(1 \pm Z/\chi hm)}$$

Siendo χ_{hm} la χ de Haenszel-Mantel:

$$\chi_{hm} = \sqrt{\frac{(n-1)\,(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

Y siendo Z la constante dependiente del porcentaje. Para un 95%, Z tiene un valor de 1,96.

4.4.5.2.2. *Test χ^2.*

El test de χ^2 de *Pearson* o test de independencia permite estimar la asociación entre dos variables sin cuantificarla, de modo que cuanto mayor sea su valor más relación habrá entre ellas. Se contrastan dos hipótesis: la hipótesis nula de independencia según la cual no existe asociación significativa entre el factor de interés y el suceso (en este caso entre un determinado

genotipo(s) y el PCa) y la hipótesis alternativa en la que sí existe esta asociación. En los estudios epidemiológicos observacionales se considera que una asociación entre dos variables es estadísticamente significativa cuando el valor *p* correspondiente al valor χ^2 es inferior a 0,05. Este valor es el grado máximo de error que se está dispuesto a tolerar en el estudio, los cual nos indica que existe menos de un 5% de probabilidades de estar cometiendo un error de tipo I (error de tipo α), es decir, afirmar que la exposición está asociada con la enfermedad cuando en realidad no lo está (falso positivo), lo cual es equivalente a rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es cierta. A continuación se muestra el procedimiento a seguir para su obtención:

Tabla 10. Tabla de contingencia (observados).

	Casos (PCa)	Controles (No PCa)	
Genotipo A	a	b	a+b
Genotipo B	c	d	c+d
	a+c	b+d	N

Tabla 11. Tabla de contingencia (esperados).

	Casos (PCa)	Controles (No PCa)
Genotipo A	[(a+c)(a+b)]/n	[(b+d)(a+b)]/n
Genotipo B	[(a+c)(c+d)]/n	[(b+d)(c+d)]/n

$$\chi^2 = \sum \frac{(observados - esperados)^2}{esperados}$$

La probabilidad asociada al valor obtenido se obtiene aplicando la distribución χ^2.

4.4.6. Análisis de estratificación por variables.

Además de analizar la asociación de cada marcador con la carcinogénesis prostática en la muestra global, ésta se ha estratificado en función de tres variables: edad, tabaquismo e índice de masa corporal (IMC). Esto permite valorar la interacción de cada una de ellas con el marcador en el desarrollo de la enfermedad, de acuerdo con su etiología multifactorial. Se analiza la relación entre la variabilidad alélica o genotípica de un marcador en relación a estas variables porque se trata de factores que afectan al medio celular.

Puesto que la carcinogénesis no afecta de forma aislada en la célula, sino que actúa de una forma dependiente del ambiente celular, debe valorarse en qué medida estos factores pueden influir en el riesgo a desarrollar un proceso carcinogénico. Esto es, pretendemos valorar la interrelación genoma-entorno en el desarrollo de la patología.

4.4.6.1. Variables analizadas.

4.4.6.1.1. *Edad.*

La edad de los individuos de la muestra se ha calculado creando la siguiente fórmula en el programa Excel:

$$edad = SIFECHA(fecha_{nacimiento}; fecha_{actual}; \text{y})$$

Donde "*y*" representa la cifra exacta en años y el valor de "$\text{fecha}_{\text{actual}}$" es diferente según se trate de un paciente o un control. En los casos este valor representa la fecha en la que se diagnosticó la enfermedad, mientras que en los controles se corresponde con la fecha del último contacto, en la cual estos individuos no presentaban carcinoma prostático.

4.4.6.1.2. *Índice de masa corporal (IMC).*

La Organización Mundial de la Salud ha establecido una fórmula para el cálculo del IMC a partir del peso y la altura de los individuos. Así mismo ha establecido una clasificación para estimar el estado nutricional de los individuos en función de su valor (Tabla 12). Éstos pueden dividirse en aquellos con bajopeso, normopeso, sobrepeso u obesidad. Dentro del grupo de individuos con sobrepeso, se ha propuesto una subdivisión: tipo I (25-26,99) y tipo II (27-29,99) (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad, SEEDO).

$$IMC = \frac{peso\ en\ kg}{(altura\ en\ m)^2}$$

Tabla 12. Clasificación del estado nutricional en función del IMC (OMS).

CLASIFICACIÓN	IMC (kg/m^2)
Bajo peso	**<18,50**
Delgadez severa	<16,00
Delgadez moderada	16,00 – 16,99
Delgadez leve	17,00 – 18,49
Normopeso	**18,50 – 24,99**
Sobrepeso	**≥ 25,00**
Sobrepeso de tipo I	25,00 – 26,99
Sobrepeso de tipo II	27,00-29,99
Obesidad	**≥ 30**
Obesidad leve	30,00 – 34,99
Obesidad media	35,00 – 39,99
Obesidad mórbida	≥ 40

4.4.6.1.3. *Tabaquismo.*

Para cuantificar el consumo tabáquico se ha utilizado el índice *pack-years*, el cual relaciona el número de cigarrillos consumidos por el individuo y el tiempo que ha estado consumiéndolos (National Cancer Institute, n.d.; Prignot, 1987).

$$pack - years = (nº\,{}^{cigarrillos}/_{día}\ x\ años\ fumando)/20$$

4.4.6.2. Análisis de estratificación.

El análisis de estratificación por variables permite detectar potencialmente aquellos estratos poblacionales en los que se refleja más claramente y con mejor precisión la influencia de un determinado genotipo en el desarrollo del PCa en combinación con la variable ambiental a considerar. Para valorar la influencia de la edad, el tabaquismo y el IMC se han establecido, en primer lugar, una serie de criterios de estratificación comunes a todos los marcadores.

Así, para la edad se ha utilizado tanto la media de edad de la muestra (65), como algunos intervalos comúnmente utilizados en la bibliografía (<60, 60-69, ≥70; <65, 65-69, ≥70). En cuanto al IMC se ha usado la media de la muestra (28) y la estratificación estandarizada comentada en el apartado anterior. En el caso del tabaquismo no se aplica un criterio homogéneo de clasificación en los trabajos publicados en la literatura científica. En muchos casos solo se establece la diferencia entre fumadores y no fumadores, mientras que en otras ocasiones, en los que se cuantifica la intensidad del consumo tabáquico, los criterios de clasificación son muy heterogéneos. Teniendo esto en mente, en este trabajo se han aplicado algunas de las clasificaciones más utilizadas en el estudio del cáncer (<10; 10-20,99; 21-40,99, ≥41 ; <10; 10-25; >25) (World Health Organization, 2004).

En cada uno de los grupos definidos utilizando estos criterios de estratificación, se ha llevado a cabo el análisis de asociación siguiendo la misma metodología que en el caso de los datos globales.

Adicionalmente, la influencia de cada variable de estratificación se ha valorado utilizando distintos puntos de corte, calculando el OR por debajo y por encima de ese punto. Estos resultados se presentan en gráficas de dispersión que permiten observar cómo se comporta un marcador en función de la evolución de la variable, detectando puntos de impacto máximos y mínimos del genotipo(s) sobre el cáncer. En aquellos intervalos en los que se obtuvieron resultados especialmente llamativos, se ha analizado el efecto combinado de variables distintas.

4.4.7. Análisis de interacción gen-gen.

Para valorar el efecto conjunto de una serie de marcadores en el desarrollo del carcinoma prostático se utilizarán distintos procedimientos: medidas del desequilibrio de ligamiento, análisis de haplotipos y análisis de combinaciones genotípicas. El análisis conjunto de varios marcadores permite poner de manifiesto el efecto que éstos ejercen sobre la carcinogénesis de manera más evidente, en comparación con su análisis individual. El análisis de haplotipos

permite obtener información más específica acerca del comportamiento de marcadores situados en el mismo cromosoma y valorar si un determinado polimorfismo está asociado con el desarrollo de la enfermedad o si sus frecuencias aparecen alteradas por presentar un desequilibrio de ligamiento con el causante real de la dolencia.

Por otra parte, el análisis de interacciones genotípicas entre polimorfismos que funcionalmente participan en la misma vía metabólica permite detectar fenómenos sinérgicos o antagónicos entre sus productos proteicos que podrían afectar al riesgo a desencadenar un proceso de carcinogénesis. De este modo, la posible funcionalidad o disfuncionalidad de una variante alélica puede acentuarse o compensarse por el efecto de otra variante localizada en el mismo gen o en la misma vía de señalización.

4.4.7.1. Desequilibrio de ligamiento (LD) y haplotipos.

El desequilibrio de ligamiento (LD) es la asociación no aleatoria entre variantes alélicas de dos o más *loci* situados a escasa distancia dentro del mismo cromosoma. Debido a su cercanía, estos *loci* no segregarán de forma aleatoria sino que podrían heredarse conjuntamente en combinaciones específicas de alelos denominadas haplotipos. Por lo tanto, dos variantes alélicas se encontrarán en LD si se transmiten conjuntamente con mayor frecuencia de lo esperado por el azar, es decir, si se localizaran en diferentes cromosomas o lo suficientemente alejados, dentro del mismo cromosoma, como para presentar un elevado grado de recombinación (Clarke *et al*., 2011).

Como se ha comentado anteriormente, se han genotipado marcadores situados en el mismo gen candidato, de modo que, aunque un polimorfismo concreto no sea el causante directo de la enfermedad podría estar en LD con otro que sí lo es. Si existe LD entre esos marcadores, la frecuencia alélica del polimorfismo neutral se verá afectada por la del polimorfismo con relevancia causal, fenómeno que se conoce como *hitchhiking* (Clarke *et al*., 2011).

La estima de las frecuencias haplotípicas a partir de los genotipos de cada marcador sería sencilla si no se dieran casos de incertidumbre. Para un conjunto de marcadores cercanos, un individuo poseerá dos haplotipos: cada uno en un cromosoma. Si consideramos dos marcadores dialélicos (*A/a, B/b*), existirán 4 haplotipos posibles (*AB, ab, Ab, aB*) (Tabla 13). Se puede saber que combinación de haplotipos presentan todos los individuos a excepción de aquellos que sean heterocigotos (*Aa*, *Bb*) para ambos marcadores. En este caso, la combinación de alelos en los cromosomas puede ser *A-B* y *a-b* o puede ser *A-b* y *a-B*, no siendo posible determinar cuál de las dos parejas de haplotipos es la correcta.

En los análisis de asociación genética, para solventar este problema, se recurre a métodos de estimación que tienen en cuenta variables con incertidumbre, siendo uno de los más conocidos el algoritmo EM (Iniesta, Guinó & Moreno, 2005). En este caso, el cálculo de las frecuencias haplotípicas se ha obtenido por medio de los programas *SHEsis* (Li *et al*., 2009) y *SNPstats* (Solé, Guinó, Valls, Iniesta & Moreno, 2006), los cuales utilizan este algoritmo para su estima. Estos programas, permiten, además, obtener el riesgo que implica portar cada haplotipo (OR, IC, χ^2) en el desarrollo la enfermedad, con respecto del resto de haplotipos (*SHEsis*) o tomando como referencia el haplotipo más frecuente (*SNPstats*).

Una vez obtenida la estima de frecuencias de haplotipos, la valoración de riesgo o protección de cada uno de ellos también puede realizarse por medio de tablas de contingencia de 2x2, lo cual permite realizar todas las comparaciones entre haplotipos que se desee.

Tabla 13. Distribución de haplotipos obtenidos a partir de los genotipos de dos marcadores dialélicos.

Genotipos	BB	Bb	Bb
AA	AB+AB	AB+Ab	Ab+Ab
Aa	AB+aB	AB+ab	Ab+ab
		Ab+aB	
aa	aB+aB	aB+ab	ab+ab

Para evaluar el desequilibrio de ligamiento entre dos marcadores se utilizan el coeficiente de *Lewontin* (*D´*) y el coeficiente de correlación (r^2), cuyos valores oscilan entre 0 y 1. Ambos coeficientes se basan en el estadístico *D*, el cual cuantifica el desequilibrio como la diferencia entre la frecuencia observada de un haplotipo formado por dos *loci* (f_{AB}) y la frecuencia que se esperaría si ambos alelos segregaran al azar ($p \cdot p_1$). Donde *p* es la frecuencia del alelo A y p_1 la frecuencia del alelo B.

$$D=f_{AB}-p \cdot p_1$$

El coeficiente de *Lewontin* (*D´*) se determina dividiendo D por su valor máximo posible (D_{max}) dadas las frecuencias alélicas de los dos *loci*. Un valor D´= 1, indica un desequilibrio de ligamiento completo y puede obtenerse esta medida incluso con la presencia de tres haplotipos de los cuatro posibles. Este coeficiente tiende a sobreestimar el desequilibrio de ligamiento existente entre dos marcadores cuando existe un tamaño muestral bajo, especialmente cuando se examinan SNPs con alelos de muy baja frecuencia. De este modo, se pueden obtener valores altos de D´ incluso cuando los marcadores se encuentran en equilibrio de ligamiento.

$$D´=D/D_{max}$$

El coeficiente de correlación (r^2) aparece menos influenciado por el tamaño muestral y se considera un mejor estimador del LD existente entre dos marcadores en el contexto de los estudios de asociación. Se refiere a la correlación entre dos alelos de dos *loci* distintos, y se calcula dividiendo D^2 por el producto de las cuatro frecuencias alélicas de los dos marcadores, donde *p* y *q* son las frecuencias de los alelos *A* y *a*, mientras que p_1 y q_1 son las frecuencias de los alelos *B* y *b*.

$$r^2=D^2/p \cdot q \cdot p_1 \cdot q_1$$

El valor de r^2 se puede interpretar como la cantidad de información que proporciona un *locus* sobre el otro. Un valor de r^2= 1 indica un LD completo, lo cual significa que los marcadores no han sido separados por recombinación y tienen exactamente las mismas frecuencias alélicas, de modo que solo se observan dos haplotipos de los cuatro posibles.

Cuando esto sucede, el análisis de un marcador proporciona información completa sobre el otro, es decir, son redundantes (Ardlie, Kruglyak & Seielstad, 2002).

Dada la complejidad de su cálculo, los valores de desequilibrio de ligamiento fueron obtenidos a partir del *software SHEsis* (Shi & He, 2005).

4.4.7.2. Análisis de interacciones genotípicas.

El análisis de la interacción genotipo-genotipo entre distintos polimorfismos se ha realizado por medio del recuento genotípico absoluto, tanto en casos como en controles. Para dos marcadores dialélicos, entre los cuales no existe desequilibrio de ligamiento, se obtienen un total de 9 combinaciones genotípicas posibles (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de combinaciones genotípicas a partir de los genotipos de dos marcadores dialélicos.

Genotipos	BB	Bb	Bb
AA	AABB	AABb	AAbb
Aa	AaBB	AaBb	Aabb
aa	aaBB	aaBb	aabb

La asociación de una o varias combinaciones genotípicas entre dos o más marcadores con el carcinoma prostático se ha valorado por medio de tablas de contingencia de 2x2, utilizando la misma metodología que en los análisis de marcadores individuales, es decir, mediante el cálculo de los OR y la significación estadística asociada a cada uno de los valores obtenidos.

El análisis de genotipos combinados aporta un valor adicional al estudio individual, permitiendo detectar potenciales interacciones entre varios marcadores que podrían reflejar de manera más precisa el impacto de los mismos sobre el desarrollo del cáncer.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En la Tabla 15 se muestra la distribución de características demográficas en la población de estudio. Se analizaron un total de 540 individuos, de los cuales 291 presentan cáncer de próstata y 249 son varones sanos usados como control. La edad media en la muestra de pacientes es de 64,79 ± 0,380 mientras que la de controles es de 66,09 ± 0,503. Se encontraron diferencias significativas (p=0,040) al comparar las medias de ambos grupos muestrales por medio de un t de *Student* para muestras independientes. En la muestra de individuos control hay dos individuos con una edad superior a la máxima edad descrita en la muestra de casos, de modo que al prescindir de estos dos sujetos en el análisis, las diferencias entre las medias de edad dejan de ser significativas. Se han realizado análisis de *Odds Ratio* ajustados por edad para evitar que esta variable pueda actuar como confusora. La media de *pack-years* consumidos en la población de casos es de 25,54 ± 1,771 y en la de controles de 24,40 ± 1,852. Para el estudio de esta variable se ha aplicado un test de *Mann-Withney*, no encontrando diferencias significativas entre la media de ambos grupos poblacionales (p= 0,743). En cuanto al IMC, se describe una media de 28,44 ± 0,237 en el grupo de casos y de 28,67 ± 0,270 en el de controles, no encontrando diferencias significativas entre ambos valores utilizando un test t *Student* para muestras independientes (p= 0,538). Los resultados de este análisis nos indican que ambos grupos muestrales están perfectamente pareados para los tres factores de estudio, evitandose así posibles sesgos que pudieran afectar al análisis del polimorfismo con la enfermedad.

Tabla 15. Distribución de características demográficas en la población de estudio

Características	Casos (n=291)		Controles (n=249)		*p*
	Media ± s.e.	Rango	Media ± s.e.	Rango	
Edad	64,79 ± 0,380	50,00-84,00	66,09 ± 0,503	49,00-91,00	**0,040**
Pack-years	25,54 ± 1,771	0,00-175,00	24,40 ± 1,852	0,00-135,00	0,743
IMC	28,44 ± 0,237	19,05-44,98	28,67 ± 0,270	20,24-38,57	0,538

5.1. *BCL2* (rs2279115).

La distribución genotípica y alélica correspondiente al rs2279115 para nuestra muestra poblacional se presenta en la Tabla 16. La distribución de frecuencias genotípicas observadas en el grupo de los individuos sanos no difiere de lo esperado en situación de equilibrio genético (χ^2= 0,001; *p*= 0,983). El alelo minoritario es el C, tanto en la muestra de casos (0,477) como en la de controles (0,469), aunque se trata de un marcador altamente polimórfico con frecuencias similares entre ambos alelos. La distribución alélica está en concordancia con lo descrito en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,370-0,490) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). La heterocigosidad esperada es elevada para este polimorfismo en el grupo de pacientes (0,501) e individuos control (0,501). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de casos y controles (t_s= 0,254; *p*= 0,799).

Tabla 16. Distribución genotípica y alélica del rs2279115 (*BCL2*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	70 (28,93)	54 (28,27)	A	0,523 ± 0,023	0,531 ± 0,026
AC	113 (46,69)	95 (49,74)	C	0,477 ± 0,023	0,469 ± 0,026
CC	59 (24,38)	42 (21,99)			
$\hat{h}$				0,501 ± 0,004	0,501 ± 0,006
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,001 (0,983)				
Estadístico t_s (*p*)				0,254 (0,799)	

El análisis de asociación entre el rs2279115 y el cáncer de próstata a nivel global (Tabla 17) arroja resultados apenas reseñables, con *Odds Ratios* de muy bajo impacto y con valores de *p* muy lejos de la evidencia estadística. A pesar de estos resultados poco significativos, parece apreciarse un riesgo máximo para los sujetos portadores del genotipo CC y una protección para aquellos que llevan en el genoma el genotipo heterocigoto AC.

Los resultados de nuestro estudio son coherentes con lo descrito en cáncer de próstata para otras poblaciones, donde el genotipo CC se erige como el genotipo de riesgo (Hyndman *et al*., 2011; Kidd *et al*., 2006).

Del mismo modo, el genotipo CC también se ha vinculado con un aumento en la susceptibilidad a desencadenar carcinoma de pulmón (Yang *et al*., 2016), glioma (Qiu *et al*., 2019) o carcinoma de tiroides (Wang *et al*., 2012). No existe, sin embargo, unanimidad entre la comunidad científica, ya que algunos autores desvelan un aumento en el riesgo de cáncer para los individuos portadores del genotipo AA. Tal es el caso de la leucemia (Al-Kofee & Ismael, 2018), el cáncer de esófago (Liu *et al*., 2012), el glioma (Li *et al*., 2014), el cáncer de mama (Bushann Meka *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2011) o el melanoma cutáneo (Oliveira *et al*., 2014).

Tabla 17. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*P*[a]
Codominante						
CC vs. AA	1,08	0,64-1,85	0,767	0,91	0,52-1,60	0,754
CC vs. AC	1,18	0,73-1,91	0,497	1,13	0,69-1,85	0,638
AA vs. AC	1,09	0,70-1,71	0,707	1,20	0,75-1,92	0,439
Dominante						
CC+AC vs. AA	0,97	0,64-1,47	0,881	0,86	0,56-1,34	0,506
Recesivo						
CC vs. AA+AC	1,14	0,73-1,80	0,559	1,04	0,65-1,66	0,865
Sobredominante						
CC+AA vs. AC	1,13	0,77-1,65	0,529	1,16	0,78-1,72	0,457
Alélico						
C vs. A	1,04	0,79-1,35	0,799	0,96	0,73-1,26	0,750

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 18 se presenta el estudio de asociación entre el polimorfismo y la carcinogénesis prostática estratificando la muestra en función de las tres variables de estudio.

La interacción del polimorfismo con la edad no arroja resultados estadísticamente significativos, aunque se obtienen valores de OR más elevados en los individuos jóvenes (<62 años) portadores del genotipo CC o AA, en comparación con aquellos que son AC.

En cuanto a la relación del polimorfismo con el PCa en función del índice de masa corporal, tampoco se desvela asociación significativa en ninguna de las categorías analizadas, aunque el efecto del genotipo CC sobre el AC se pone más de manifiesto en los varones que presentan obesidad de tipo II (27-29,99) (OR= 2,16).

Sin embargo, es en el análisis de asociación del rs2279115 con el tabaquismo en donde se muestran los resultados de más impacto, desvelando valores estadísticamente significativos. Concretamente, los individuos consumidores de una cantidad media-alta de tabaco (21-40,9 py) y portadores del genotipo homocigoto CC manifiestan casi 7 veces más riesgo de padecer cáncer de próstata que aquellos con el mismo hábito tabáquico pero que son portadores del genotipo heterocigoto AC (OR= 6,70; *p*= 0,003).

Los varones fumadores de esta cantidad de tabaco portadores del genotipo homocigoto AA también presentan una mayor susceptibilidad a la enfermedad que los portadores del genotipo AC, con un incremento en el riesgo cuatro veces superior (OR= 4,73; *p*= 0,020). Aunque se obtiene un alto impacto en el modelo sobredominante (OR=5,71; *p*= 0,001), la predisposición es mayor para los individuos con el genotipo CC que para los AA, por lo que el comportamiento del marcador no se ajustaría por completo a un modelo de sobredominancia.

Por lo tanto, aunque a nivel global el impacto de las variantes de este SNP en el inicio del PCa es apenas reseñable, su efecto diferencial se pone de manifiesto ante un estrés genotóxico causado por el tabaquismo. De acuerdo con estos resultados, en células de cáncer de pulmón se ha descrito que ciertos componentes del tabaco como la nicotina o el carcinógeno NNK potencian la función anti-apoptótica de la proteína Bcl-2 por medio de la fosforilación en el residuo ser[70], lo cual estabiliza el heterodímero formado con Bax para su inhibición y favorece

la cooperación con la oncoproteína c-Myc en garantizar la supervivencia celular (Deng, 2014; Jin, Gao, Flagg & Deng, 2004; Mai, May, Gao, Jin & Deng, 2003). Teniendo en cuenta que el aumento en la expresión del Bcl-2 se ha asociado con un aumento en la transición desde un epitelio prostático normal a una neoplasia debido a su función anti-apoptótica (Catz & Johnson, 2003; Kidd *et al*., 2006), es posible que los componentes del tabaco contribuyan a potenciar todavía más tal función, desembocando en la oncogénesis.

En este trabajo se encuentra que tanto el genotipo CC como, en menor medida, el AA, son parcialmente disfuncionales. Los individuos con el genotipo heterocigoto AC portan ambas variantes, por lo que puede producirse un efecto de compensación de la disfuncionalidad parcial de ambos alelos. Esto condiciona que en el medio celular haya una funcionalidad más completa para los heterocigotos AC, y como tal, son lo que presentan una menor predisposición a desarrollar cáncer de próstata.

Como se ha comentado en la introducción, el efecto funcional de este polimorfismo en la expresión del gen *BCL2* no está esclarecida y parece estar involucrado en más de un mecanismo (Bachmann *et al*., 2011; Eun *et al*., 2011; Nückel *et al*., 2007; Pan *et al*., 2015). Si tanto el alelo A como el alelo C se han asociado con una mayor actividad transcripcional del gen *BCL2*, los individuos portadores de solo un alelo podrían compensar, en parte, la posible disfuncionalidad en la apoptosis de individuos con una doble dotación alélica.

Por otra parte, de acuerdo con un efecto diferencial entre ambos homocigotos, en el estudio de Hu y colaboradores (2008), se ha visto una mayor capacidad apoptótica para las células portadoras del genotipo AA cuando son sometidas al carcinogéno BPDE en comparación con aquellas CC, lo cual podría explicar el riego de cáncer más acusado para aquellos sujetos portadores del genotipo homocigoto CC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 18. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	AA	20	7	CC vs. AA	1,05	0,31-3,57	0,937
<62	AC	26	16	CC vs. AC	1,85	0,64-5,32	0,253
	CC	21	7	AA vs. AC	1,76	0,61-5,10	0,295
	AA	50	45	CC vs. AA	1,01	0,54-1,86	0,985
≥62	AC	84	79	CC vs. AC	1,05	0,60-1,83	0,860
	CC	38	34	AA vs. AC	1,04	0,63-1,74	0,865
Tabaquismo (PY)							
	AA	25	13	CC vs. AA	0,56	0,20-1,59	0,274
No fumadores	AC	35	33	CC vs. AC	1,02	0,41-2,57	0,964
	CC	13	12	AA vs. AC	1,81	0,80-4,12	0,154
	AA	43	39	CC vs. AA	1,49	0,79-2,83	0,221
Fumadores	AC	74	61	CC vs. AC	1,35	0,76-2,42	0,304
	CC	46	28	AA vs. AC	0,91	0,52-1,58	0,734
	AA	38	26	CC vs. AA	0,80	0,38-1,68	0,550
<21	AC	63	52	CC vs. AC	0,96	0,50-1,86	0,910
	CC	28	24	AA vs. AC	1,21	0,65-2,24	0,553
	AA	12	3	CC vs. AA	1,42	0,24-8,43	0,698
21-40,99	AC	22	26	CC vs. AC	6,70	1,90-23,65	**0,003**
	CC	17	3	AA vs. AC	4,73	1,26-17,77	**0,020**
	AA	18	23	CC vs. AA	1,38	0,52-3,67	0,520
≥41	AC	24	16	CC vs. AC	0,72	0,27-1,93	0,509
	CC	14	13	AA vs. AC	0,52	0,22-1,26	0,147
IMC							
	AA	13	7	CC vs. AA	0,97	0,23-4,13	0,966
<25	AC	15	8	CC vs. AC	0,96	0,23-3,93	0,954
	CC	9	5	AA vs. AC	0,99	0,28-3,53	0,988
	AA	15	7	CC vs. AA	0,47	0,11-2,00	0,297
25-26,99	AC	18	13	CC vs. AC	0,72	0,19-2,79	0,633
	CC	6	6	AA vs. AC	1,55	0,49-4,91	0,454
	AA	22	8	CC vs. AA	1,30	0,40-4,20	0,660
27-29,99	AC	38	23	CC vs. AC	2,16	0,81-5,75	0,121
	CC	25	7	AA vs. AC	1,66	0,64-4,35	0,296
	AA	15	18	CC vs. AA	1,64	0,58-4,64	0,351
≥30	AC	34	24	CC vs. AC	0,96	0,37-2,47	0,936
	CC	15	11	AA vs. AC	0,59	0,25-1,39	0,226

La asociación del polimorfismo con el cáncer de próstata valorando la interacción entre las variables de estudio se muestra en la Tabla 19. Aunque se obtienen *Odds Ratios* elevados al llevar a cabo el análisis de asociación entre la edad y el tabaquismo, no se observan resultados significativos. La disminución del tamaño muestral al subdivir en función de los grupos de estratificación más reseñables compromete la fiabilidad estadística del estudio.

Tabla 19. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD <62 &	AA	3	1	CC vs. AA	2,67	0,12-60,61	0,522
PY 21-40,99	AC	5	5	CC vs. AC	8,00	0,80-70,77	0,069
	CC	8	1	AA vs. AC	3,00	0,22-41,08	0,393
EDAD <62 &	AA	7	1	CC vs. AA	0,71	0,03-15,92	0,825
IMC 27-29,99	AC	9	3	CC vs. AC	1,67	0,13-21,78	0,688
	CC	5	1	AA vs. AC	2,33	0,19-28,10	0,494

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2. *CASP9* (rs1052576).

En la Tabla 20 se detalla la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del rs1052576 en nuestro estudio. No existen evidencias en contra de que la población de controles se encuentre en equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 3,103; *p*= 0,075). El alelo G es el menos frecuente, tanto en la muestra de casos (0,496) como en la de controles (0,466). No obstante, las frecuencias entre ambos alelos son muy equilibradas, observándose valores de heterocigosidad cercanos al 50%. Esta distribución está en concordancia con lo encontrado en otras poblaciones de ancestralidad europea, en las cuales la frecuencia del alelo G oscila entre valores de 0,390 y 0,550. (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de casos y controles (t_s= 0,884; *p*= 0,377).

Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del rs1052576 (*CASP9*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	52 (21,40)	60 (31,75)	A	0,504 ± 0,023	0,534 ± 0,026
GA	141 (58,02)	82 (43,39)	G	0,496 ± 0,023	0,466 ± 0,026
GG	50 (20,58)	47 (24,87)			
$\hat{h}$				0,502 ± 0,003	0,500 ± 0,006
Eq. H-W x^2 (*p*)	3,103 (0,075)				
Estadístico t_s (*p*)				0,884 (0,377)	

En la Tabla 21 se muestra el análisis de asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata a nivel global. La valoración conjunta de los modelos genéticos apunta a un efecto de riesgo para el alelo G y un comportamiento protector para el A, especialmente cuando éste último se encuentra en homocigosis. Los modelos en donde se obtiene un máximo impacto son aquellos en donde se compara el genotipo GA con el AA. De este modo, se obtienen valores estadísticamente significativos en los modelos codominante, dominante y sobredominante.

En el modelo dominante se observa que los varones con al menos una copia del alelo G manifiestan una susceptibilidad mayor al cáncer de próstata que aquellos AA (OR= 1,71; *p*= 0,015). Aunque en el modelo sobredominante se muestra un efecto de riesgo para el genotipo GA en comparación con cualquiera de los homocigotos (OR= 1,80; *p*= 0,003), cuando se analiza el efecto de cada genotipo individualmente solo se obtiene una asociación estadísticamente significativa en la comparación GA vs. AA (OR= 1,98; *p*= 0,003). Todos los modelos son coherentes, por lo tanto, al desvelar un efecto protector máximo para aquellos sujetos portadores del genotipo homocigoto AA.

Teniendo en cuenta que el alelo G es el ancestral, el efecto protector que pudiera suponer la variante A podría explicar la elevada frecuencia observada para este alelo.

Estos resultados son coherentes con los descritos en otros tipos de cáncer, como el linfoma (Lan *et al*., 2007), el mieloma múltiple (Hosgood *et al*., 2008) o el glioma (Ozdogan *et al*., 2017), los cuales describen un efecto protector máximo para los individuos que solo expresan

en su genoma la variante alélica A. Los resultados derivados de tres meta-análisis (Xu *et al*., 2012; Yan *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2013) también desvelan un efecto protector para este alelo, aunque se obtiene un efecto más claro para población Mongoloide que Caucasoide.

Los resultados encontrados en nuestro estudio coinciden con los descritos en otro trabajo en el que se examina la asociación de este polimorfismo con el desarrollo de PCa en población turca. Aunque los resultados no alcanzan la significación estadística debido al bajo número de individuos testados, se observa una tendencia de riesgo para los varones portadores tanto del genotipo GA (OR=1,29) como del GG (OR=1,13) (Yilmaz *et al*., 2017).

Puesto que el rs1052576 involucra la sustitución del aminoácido glutamina (C**A**G, Q) por arginina (C**G**G, R) en el codón 221 de la caspasa-9, se ha propuesto que el cambio nucleotídico podría afectar a la conformación de la proteína, modificando su afinidad de unión por el Apaf-1 y alterando, por lo tanto, la actividad del apoptosoma (Xu *et al*., 2012). De este modo, el genotipo AA (QQ) podría tener un efecto protector frente al desarrollo del cáncer porque estaría relacionado con una mayor afinidad de la caspasa-9 por el Apaf-1, lo cual implicaría una mayor actividad del apoptosoma y, por lo tanto, un incremento en la capacidad apoptótica. Alternativamente, los individuos portadores de la variante G (R) podrían tener una menor capacidad apoptótica debido a una activación deficiente de la caspasa-9 en el apoptosoma, favoreciendo la transformación maligna. No obstante, esta hipótesis debe ser validada en el futuro.

Tabla 21. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	1,23	0,71-2,12	0,460	1,29	0,73-2,29	0,381
GA vs. AA	1,98	1,25-3,14	**0,003**	2,14	1,32-3,46	**0,002**
GA vs. GG	1,62	0,99-2,62	0,050	1,69	1,02-2,80	**0,040**
Dominante						
GG+GA vs. AA	1,71	1,11-2,63	**0,015**	1,84	1,17-2,90	**0,009**
Recesivo						
GG vs. GA+AA	0,78	1,23-2,65	0,289	0,77	0,48-1,23	0,273
Sobredominante						
GA vs. GG+AA	1,80	1,23-2,65	**0,003**	1,93	1,29-2,88	**0,001**
Alélico						
G vs. A	1,13	0,86-1,48	0,377	1,16	0,87-1,54	0,320

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 22 se muestran los intervalos de mayor impacto en el análisis de asociación entre este polimorfismo y el PCa cuando se estratifica la muestra en función de diferentes variables.

Al analizar la variable edad se obtiene un máximo riesgo del genotipo heterocigoto GA en los sujetos con una edad inferior a los 66 años, tanto en referencia a homocigotos GG como, especialmente en comparación con homocigotos AA (OR=2,48; *p*= 0,012). Aunque en los

individuos con una edad superior a este intervalo también se obtienen resultados significativos (p= 0,049), el efecto diferencial del genotipo GA sobre el AA no es tan elevado (OR= 1,89).

A medida que se produce el envejecimiento se acumulan en la célula especies reactivas de oxígeno que causan daño en el ADN y disfunción mitocondrial. Si estas lesiones no son reparadas pueden conducir a la transformación maligna de la célula. Aunque las especies reactivas de oxígeno suelen causar la inhibición de las caspasas, una generación excesiva de las mismas puede conducir a la muerte celular por necrosis (Degterev, Boyce & Yuan, 2003). Esto podría explicar por qué el efecto diferencial de los genotipos de este marcador es menor en personas con edad avanzada.

En cuanto al tabaquismo, se observa un efecto protector máximo para el genotipo AA en los individuos no fumadores en referencia a los sujetos heterocigotos (OR= 0,22; p<0,001). Aunque también se obtiene una disminución en el riesgo para los varones no fumadores con el genotipo GG en comparación con los heterocigotos, tanto el valor de OR como la significación estadística son notablemente diferentes a los del caso anterior (OR= 0,31; p= 0,014).

Cuando se valora el efecto diferencial de los genotipos en función del consumo de tabaco, se observa que el riesgo de cáncer se acentúa en los individuos con el genotipo GA en comparación con aquellos con el AA a medida que se pasa de un consumo bajo-moderado (<21 py) a otro medio-alto (21-40,99). De esta forma, la susceptibilidad al cáncer de próstata para los varones con el genotipo heterocigoto se duplica en comparación con la que presentan los sujetos con el genotipo AA en el primer estrato del tabaquismo (OR= 2,41; p= 0,006) y se cuatriplica en el segundo (OR= 3,94; p= 0,012).

Los individuos fumadores están expuestos a carcinógenos del tabaco como el benzopireno, los cuales provocan la formación de aductos en el ADN y, en última instancia, roturas genómicas. Células con el genoma dañado deben ser eliminadas para evitar la carcinogénesis. Las personas fumadoras con una capacidad de apoptosis reducida, como podría ser el caso de los individuos portadores del alelo G (R), tendrían una mayor susceptibilidad al carcinoma prostático.

En nuestra población no se obtienen resultados estadísticamente significativos en los individuos con un consumo tabáquico muy elevado (≥41). De acuerdo con estos resultados, se ha visto que la asociación entre polimorfismos del gen *CASP9* y el riesgo de cáncer de pulmón era estadísticamente significativa en consumidores moderados de tabaco (≤39 py) pero no en el grupo de elevado consumo (>39 py) (Ghavami *et al*., 2014; Park *et al*., 2006). En este sentido, se ha propuesto que los carcinógenos del tabaco, aplicados en muy altas concentraciones pueden anular la predisposición genética al cáncer (Vineis, 1997).

En lo que respecta al IMC, en la categoría de individuos con obesidad (≥30) se ha desvelado un aumento en el riesgo de PCa tanto para los portadores de una copia del alelo G (OR= 3,48) como de dos copias (OR= 2,57), aunque solo se obtiene evidencia estadística en el primer caso (p= 0,005).

Los individuos obesos liberan una cantidad elevada de citoquinas proinflamatorias, las cuales pueden producir daño en el ADN a través de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. La obesidad se ha asociado, además, con una mayor concentración de leptina e insulina, hormonas que favorecen la proliferación celular. La apoptosis sería necesaria, por lo tanto, para evitar la hiperproliferación celular y favorecer la eliminación de células sometidas a un estrés oxidativo. Los varones obesos precisarían del correcto funcionamiento de moléculas pro-

apoptóticas para evitar una proliferación descontrolada. Aquellos con la variante G (R) podrían tener una deficiencia en la activación de la caspasa-9, por lo que su riesgo sería mayor. Apoyando esta hipótesis, se ha visto que en los sujetos obesos se genera un estado de hiperinsulinemia, lo cual desencadena un aumento en las concentraciones del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), con propiedades anti-apopóticas (Herrera-Covarrubias *et al*., 2015; López-Fontana *et al*., 2009).

En la Tabla 23 se muestra la asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata en función de la interacción entre las distintas variables de estudio.

Se han encontrado resultados estadísticamente significativos al valorar conjuntamente el consumo tabáquico y la edad en la comparación GA vs. AA. De este modo, el efecto diferencial de los genotipos es más acentuado en los individuos con una edad inferior a los 66 años y consumidores de una cantidad media-alta de tabaco (OR= 6,86; p= 0,012) que en aquellos del mismo rango etario pero no fumadores (OR= 5,36; p= 0,010). Los carcinógenos del tabaco podrían, por lo tanto, evidenciar de forma más clara el riesgo diferencial de las variantes del rs1052576, en tanto que necesitarían de una capacidad apoptótica mayor de las células en respuesta a una acumulación de aductos en el ADN.

Aunque no se obtienen resultados tan claros, también existe una interacción entre el tabaquismo y el IMC. De este modo, se observa un aumento en la susceptibilidad al PCa para los varones que portan en el genoma el alelo G, en homocigosis y en heterocigosis, cuando son obesos y consumidores de una cantidad media-alta de tabaco ($OR_{GA/AA}$= 6,40; p= 0,046; $OR_{GA+GG/AA}$= 6,86; p= 0,027) que en el caso de presentar obesidad pero ser no fumadores, cuyos valores no alcanzan la significación estadística.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Sharpe y Siemiatycki (2001), los cuales desvelan que, entre aquellos hombres con alto IMC, los que además son fumadores, experimentan un incremento en el riesgo de PCa comparado con hombres con un mismo IMC pero no fumadores. Como se ha visto anteriormente, el tabaquismo y la obesidad son factores que pueden propiciar un microambiente tumoral, por lo que podría producirse un efecto sinérgico entre ambos. Ante esta situación estresante, el genotipo AA podría asociarse con una respuesta apoptótica más eficaz, previniendo la instauración de un carcinoma de próstata.

Tabla 22. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	GG	25	18	GG vs. AA	1,15	0,51-2,60	0,737
<66	GA	69	23	GA vs. AA	2,48	1,22-5,06	**0,012**
	AA	29	24	GA vs. GG	2,16	1,01-4,63	**0,047**
	GG	24	29	GG vs. AA	1,28	0,60-2,75	0,526
≥66	GA	71	58	GA vs. AA	1,89	1,00-3,58	**0,049**
	AA	22	34	GA vs. GG	1,48	0,78-2,81	0,231
Tabaquismo (PY)							
	GG	11	14	GG vs. AA	1,40	0,50-3,94	0,517
No fumadores	GA	48	19	GA vs. AA	4,51	1,98-10,28	**<0,001**
	AA	14	25	GA vs. GG	3,22	1,26-8,20	**0,014**
	GG	38	33	GG vs. AA	1,06	0,54-2,05	0,873
Fumadores	GA	90	60	GA vs. AA	1,38	0,77-2,44	0,276
	AA	36	33	GA vs. GG	1,30	0,74-2,30	0,362
	GG	25	23	GG vs. AA	1,41	0,66-3,01	0,374
<21	GA	78	42	GA vs. AA	2,41	1,29-4,48	**0,006**
	AA	27	35	GA vs. GG	1,71	0,87-3,37	0,120
	GG	12	8	GG vs. AA	2,17	0,63-7,50	0,217
21-40,99	GA	30	11	GA vs. AA	3,94	1,34-11,57	**0,012**
	AA	9	13	GA vs. GG	1,82	0,59-5,65	0,297
	GG	12	16	GG vs. AA	0,54	0,18-1,63	0,266
≥41	GA	30	26	GA vs. AA	0,82	0,31-2,18	0,695
	AA	14	10	GA vs. GG	1,54	0,61-3,85	0,354
IMC							
	GG	5	7	GG vs. AA	0,32	0,06-1,66	0,165
<25	GA	23	9	GA vs. AA	1,14	0,28-4,71	0,859
	AA	9	4	GA vs. GG	3,58	0,92-13,97	0,064
	GG	28	20	GG vs. AA	0,93	0,41-2,14	0,870
25-29,99	GA	70	25	GA vs. AA	1,87	0,88-3,95	0,101
	AA	27	18	GA vs. GG	2,00	0,96-4,15	0,062
	GG	14	10	GG vs. AA	2,57	0,88-7,50	0,082
≥30	GA	38	20	GA vs. AA	3,48	1,45-8,36	**0,005**
	AA	12	22	GA vs. GG	1,36	0,51-3,62	0,539

Tabla 23. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
PY= 0 &	GG	8	5	GG vs. AA	2,06	0,46-9,30	0,340
EDAD <66	GA	25	6	GA vs. AA	5,36	1,47-19,53	**0,010**
	AA	7	9	GA vs. GG	2,60	0,63-10,78	0,182
PY= 0 &	GG	3	1	GG vs. AA	3,60	0,28-46,67	0,310
IMC ≥30	GA	10	2	GA vs. AA	6,00	0,91-39,50	0,057
	AA	5	6	GA vs. GG	1,67	0,10-27,31	0,712
PY 21-40,9 &	GG	4	2	GG vs. AA	2,29	0,31-16,94	0,407
EDAD <66	GA	18	3	GA vs. AA	6,86	1,49-31,55	**0,012**
	AA	7	8	GA vs. GG	3,00	0,38-23,81	0,289
PY 21-40,99 &	GG	4	2	GG vs. AA	8,00	0,84-76,28	0,062
IMC ≥30	GA	8	5	GA vs. AA	6,40	0,99-41,42	**0,046**
	AA	2	8	GA vs. GG	0,80	0,10-6,44	0,829
EDAD <66 &	GG	9	4	GG vs. AA	3,75	0,80-17,67	0,089
IMC ≥30	GA	16	9	GA vs. AA	2,96	0,81-10,86	0,097
	AA	6	10	GA vs. GG	0,79	0,19-3,37	0,747

5.3. *CASP8* (rs1045485).

La distribución de genotipos y alelos correspondientes al rs1045485 se muestra en la Tabla 24. Las frecuencias genotípicas en el grupo de controles no difieren de lo esperado en una situación de equilibrio genético (χ^2= 4,370; *p*= 0,038) tras la aplicación de la corrección de *Bonferroni-Sidak* para comparaciones múltiples que disminuye el nivel de significación hasta 0,003. El alelo C es el minoritario, tanto en casos (0,137) como en controles (0,120), y presenta una frecuencia similar a la descrita en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,100-0,150) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). La heterocigosidad esperada para este marcador es baja en la muestra de casos (0,238) y de controles (0,212). Mediante el estadístico t_s no se detectan diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de ambos grupos muestrales (t_s=0,839; *p*=0,401).

Tabla 24. Distribución genotípica y alélica del rs1045485 (*CASP8*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
GG	212 (73,61)	194 (78,86)	G	0,863 ± 0,014	0,880 ± 0,015
CG	73 (25,35)	45 (18,29)	C	0,137 ± 0,014	0,120 ± 0,015
CC	3 (1,04)	7 (2,85)			
$\hat{h}$				0,238 ± 0,029	0,212 ± 0,032
Eq. H-W x^2 (*p*)	4,370 (0,038)				
Estadístico t_s (*p*)				0,839 (0,401)	

El análisis de asociación del rs1045485 con el cáncer de próstata a nivel global (Tabla 25) desvela valores estadísticamente significativos y de alto impacto, por lo que este marcador parece presentar una considerable influencia en el desarrollo de la enfermedad. Se encuentra una coherencia entre los modelos genéticos, de modo que no se producen contradicciones, aunque algunos son más informativos que otros.

El modelo codominante es, en este caso, el que nos aporta más información acerca del comportamiento del marcador, aunque el dominante también desvela datos interesantes. Solo se observan resultados significativos en la comparación CG vs. CC, presentando los varones con el genotipo heterocigoto casi cuatro veces más riesgo que aquellos con el genotipo homocigoto CC (OR= 3,79; OR= 0,049). No obstante, también se observa un notable aumento en el riesgo de PCa para los individuos con el genotipo GG ($OR_{GG/CC}$= 2,55) y para los portadores del alelo G ($OR_{GG+CG/CC}$= 2,78), con una susceptibilidad casi tres veces superior en referencia a aquellos CC.

Por lo tanto, los modelos en los que mayor impacto se encuentra son aquellos donde las clases genotípicas son contrastadas con respecto del genotipo CC. En conclusión, un análisis conjunto de la información apunta claramente a que el alelo G es el de riesgo, tanto en homocigosis (GG) como en heterocigosis (CG), en tanto que el alelo C es el protectivo, lo que se refleja particularmente en los individuos que solamente expresan en su genoma la variante alélica C (homocigoto CC).

La baja heterocigosidad del marcador condiciona que el homocigoto CC se encuentre en frecuencias muy bajas en la población (1,04% en casos y 2,85% en controles). Como consecuencia, el carácter conservativo de los estadísticos aplicados hace que éstos no lleguen a alcanzar la significación en algunas comparaciones. Ello no obvia la realidad biológica que aporta el carácter de riesgo/protección de los alelos G/C, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la información obtenida a partir de otros estudios en cáncer, como el de mama (Cox *et al*., 2007; McPherson *et al*., 2004; Shepard *et al*., 2009; Suela *et al*., 2010; Vahednia *et al*., 2019), el de leucemia (Enjuanes *et al*., 2008) o el melanoma (Li *et al*., 2008), donde sistemáticamente se apunta al carácter protectivo del alelo C, especialmente para los individuos con el genotipo CC.

De acuerdo con nuestros resultados, en el estudio de Lubahn y colaboradores (2010) se describe un descenso en el riesgo de padecer cáncer de próstata de tipo agresivo asociado con el alelo C, presentando el genotipo CC el efecto más protector. Los autores proponen que esta variante pudiera interaccionar con el eje hormonal. La caspasa-8 interacciona directamente con el receptor androgénico inhibiendo la expresión génica AR-dependiente, apoyando la hipótesis de que el efecto de esta variante sobre el desarrollo de PCa agresivo pueda estar relacionado con la señalización esteroidea.

Partimos de la base de que este polimorfismo implica el cambio del aminoácido aspartato (D, **G**AT) por histidina (H, **C**AT) en el residuo 302 de la proteína caspasa-8, pudiendo afectar al autoprocesamiento de la proteína y a la interacción con el factor anti-apoptótico c-FLIP (Bethke *et al*., 2009). Es posible que los genotipos GG y CG, que codifican para los aminoácidos DD y DH, favorezcan una configuración de la proteína que mejore la interacción de la caspasa-8 con la proteína c-$FLIP_L$ en lugar de formar un homodímero exclusivo de caspasa-8. Este heterodímero casp8-c$FLIP_L$ permitiría la activación de rutas pro-supervivencia en lugar de apoptóticas, desembocando en la proliferación tumoral. Apoyando esta hipótesis, se ha visto una reducción en la capacidad apoptótica de células portadoras de los genotipos DD y DH en comparación con la de aquellas HH (Hu *et al*., 2008).

Tabla 25. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. CC	2,55	0,68-9,57	0,165	2,30	0,56-9,38	0,246
CG vs. CC	3,79	1,00-14,31	**0,049**	3,20	0,76-13,52	0,113
CG vs. GG	1,48	0,98-2,26	0,064	1,52	0,99-2,33	0,055
Dominante						
GG+CG vs. CC	2,78	0,75-10,31	0,125	2,49	0,61-10,10	0,203
Recesivo						
GG vs. CC+CG	0,75	0,50-1,12	0,157	0,72	0,50-1,09	0,120
Sobredominante						
CG vs. GG+CC	1,52	1,00-2,30	0,050	1,54	1,01-2,36	**0,045**
Alélico						
G vs. C	0,86	0,60-1,23	0,403	0,82	0,57-1,19	0,300

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 26 se muestran los intervalos de mayor interés en el análisis de asociación entre el polimorfismo rs1045485 y el PCa estratificando en función de diferentes variables.

Al analizar la variable edad los resultados más significativos se obtienen en aquellos individuos menores de 67 años, donde portar la variante alélica G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, implica un riesgo siete veces superior de padecer PCa en comparación con personas del mismo rango etario que llevan en el genoma el alelo C en homocigosis (OR= 7,22; *p*= 0,037).

El mayor efecto protector del genotipo CC en personas relativamente jóvenes confirma los resultados obtenidos en carcinoma de mama para mujeres menores de 60 años (Cox *et al*., 2007). Este resultado es aparentemente contradictorio ya que las especies reactivas de oxígeno que se liberan con el envejecimiento suelen causar la inhibición de las caspasas, incrementando la probabilidad tumoral. No obstante, se ha visto que en muchos casos una generación excesiva de ROS no impide la muerte celular, sino que dirige a las células a una muerte independiente de caspasas como la necrosis (Degterev, Boyce & Yuan, 2003).

La variable tabaquismo no parece tener una gran influencia en la relación de este polimorfismo con el cáncer de próstata, ya que los valores de máximo impacto se obtienen en varones no fumadores. En este estrato es en donde se manifiesta con más fuerza el efecto diferencial de los genotipos, presentando los individuos portadores del alelo G el máximo riesgo frente al desarrollo de PCa ($OR_{GG/CC}$= 4,36; $OR_{CG/CC}$= 7,14). Aunque no se obtiene suficiente evidencia estadística, se alcanzan valores cercanos en la comparación CG vs. CC (*p*= 0,059). Cuando se estratifica esta variable en función del consumo de tabaco, la asociación de los genotipos de este polimorfismo con el cáncer se manifiesta con más fuerza en personas no fumadoras o consumidoras de menos de 35 py. Aunque solo se obtiene significación estadística cuando se compara el genotipo heterocigoto con el homocigoto CC (OR= 5,00; *p*= 0,045), se obtiene la misma tendencia en la comparación de homocigotos (OR= 2,84).

En cuanto al índice de masa corporal, el riesgo de los diferentes genotipos sobre el PCa se pone de manifiesto en aquellos individuos con un IMC menor de 28. Tanto portadores del genotipo GG como del CG muestran un incremento en la susceptibilidad a este cáncer con respecto de aquellos CC (OR= 7,34 y OR= 5,00, respectivamente), aunque solo resulta significativa la comparación de homocigotos (*p*= 0,049).

Por lo tanto, el mayor impacto de la influencia genética es en condiciones normales, no excepcionales (longevidad, tabaquismo, obesidad). El factor que cobra protagonismo es la variabilidad genotípica, no los factores ambientes que pueden enmascarar dicho efecto. Teniendo en cuenta que la apoptosis es la respuesta final de una célula ante un proceso carcinogénico, en este caso tiene más relevancia el tipo de genotipo/alelo que los factores ambientales a los que se esté expuesto, ejerciendo el genotipo CC el máximo efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad.

Tabla 26. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	GG	127	93	GG vs. CC	6,83	1,00-44,95	**0,045**
<67	CG	42	24	CG vs. CC	8,75	1,30-58,86	**0,024**
	CC	1	5				
	GG	79	100	GG vs. CC	0,40	0,04-4,12	0,436
≥67	CG	29	20	CG vs. CC	0,73	0,06-8,68	0,798
	CC	2	1				
Tabaquismo (PY)							
	GG	61	56	GG vs. CC	4,36	0,56-34,11	0,159
No fumadores	CG	25	14	CG vs. CC	7,14	0,91-56,28	0,059
	CC	1	4				
	GG	146	135	GG vs. CC	1,08	0,15-7,81	0,938
Fumadores	CG	45	30	CG vs. CC	1,50	0,20-11,25	0,691
	CC	2	2				
	GG	143	126	GG vs. CC	2,84	0,58-13,94	0,198
<35	CG	50	25	CG vs. CC	5,00	1,02-24,42	**0,045**
	CC	2	5				
	GG	64	65	GG vs. CC	0,98	0,06-16,26	0,991
≥35	CG	20	19	CG vs. CC	1,05	0,06-18,70	0,972
	CC	1	1				
IMC							
	GG	92	67	GG vs. CC	7,34	1,00-53,74	**0,049**
<28	CG	29	17	CG vs. CC	5,00	0,57-43,75	0,142
	CC	0	2				
	GG	94	84	GG vs. CC	1,12	0,22-5,72	0,892
≥28	CG	34	19	CG vs. CC	1,79	0,33-9,73	0,497
	CC	3	3				

La asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata teniendo en cuenta la interacción entre las tres variables de estudio se muestra en la Tabla 27.

Aunque no se ha encontrado asociación significativa en ninguna de las combinaciones estudiadas, probablemente debido al escaso número de individuos en algunas clases genotípicas, sí que se aprecian ciertas tendencias. El riesgo de portar la variante G en el desarrollo del PCa, tanto en homocigosis como en heterocigosis, se manifiesta con más fuerza en los individuos con una edad inferior a 67 años, no fumadores o con un consumo tabáquico inferior a 35 *pack-years* y un IMC inferior a 28. La mayor interacción se muestra entre la edad y el tabaquismo, con un OR de 7,06 para la combinación genotípica CG vs. CC.

Tabla 27. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD <67 &	GG	85	64	GG vs. CC	5,31	0,72-39,31	0,101
PY <35	CG	30	17	CG vs. CC	7,06	0,92-54,11	0,058
	CC	1	4				
EDAD <67 &	GG	59	33	GG vs. CC	3,53	0,35-35,50	0,282
IMC <28	CG	18	10	CG vs. CC	3,45	0,30-39,38	0,311
	CC	0	1				
PY <35 &	GG	64	49	GG vs. CC	3,90	0,46-33,42	0,212
IMC <28	CG	22	12	CG vs. CC	5,31	0,59-47,89	0,132
	CC	0	2				
EDAD <67 &	GG	40	25	GG vs. CC	3,15	0,30-33,17	0,335
PY <35 & IMC <28	CG	15	9	CG vs. CC	3,20	0,27-37,84	0,348
	CC	0	1				

5.4. *CASP3* Y *CASP7*.

5.4.1. rs1049216 (*CASP3*).

La distribución de frecuencias genotípicas y alélicas para el rs1049216 se muestra en la Tabla 28. No se encuentran desviaciones del equilibrio genético en la muestra de controles (χ^2= 0,065; *p*= 0,800). La variante alélica G es la minoritaria en nuestra población de estudio, con una frecuencia superior en la subpoblación de casos (0,241) que de controles (0,212), aunque las diferencias no son significativas (t_s= 1,003; *p*= 0,316). La frecuencia del alelo G es similar a la encontrada en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,220-0,330) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Se observa un índice de heterocigosidad para este marcador de 0,367 en el grupo de pacientes y de 0,336 en el de individuos sanos.

Tabla 28. Distribución genotípica y alélica del rs1049216 (*CASP3*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	143 (58,85)	118 (61,78)	A	0,759 ± 0,019	0,788 ± 0,021
AG	83 (34,16)	65 (34,03)	G	0,241 ± 0,019	0,212 ± 0,021
GG	17 (6,99)	8 (4,19)			
$\hat{h}$				0,367 ± 0,029	0,336 ± 0,034
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,065 (0,800)				
Estadístico t_s (*p*)				1,003 (0,316)	

El análisis de asociación del rs1049216 con el desarrollo de cáncer de próstata a nivel global se muestra en la Tabla 29. El genotipo GG parece asociarse con un mayor riesgo de PCa según los modelos de herencia recesivo y codominante, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Así, los individuos con el genotipo GG presentan un 72% más de riesgo de padecer PCa que aquellos portadores del alelo A y un 75% más de riesgo en referencia a portadores del alelo A en homocigosis. En el resto de los modelos genéticos se observan resultados próximos a la neutralidad, aunque en la comparación de alelos parece apreciarse un ligero aumento en el riesgo para los individuos portadores del alelo G en comparación con aquellos con la variante A (OR= 1,18).

Este es el primer estudio en valorar la asociación del rs1049216 con el cáncer de próstata. Apoyando nuestros resultados, se ha visto un efecto protector del alelo A (rs1049216) en carcinoma de esófago (Zhang *et al*., 2012). Por el contrario, se ha descrito una relación opuesta en mieloma múltiple (Hosgood *et al*., 2008) y linfoma (Lan *et al*., 2007), asociándose el alelo G con un descenso en el riesgo de cáncer.

Tabla 29. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*P*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	1,75	0,74-4,18	0,204	1,66	0,68-4,06	0,267
AG vs. AA	1,05	0,70-1,58	0,801	0,90	0,58-1,38	0,624
GG vs. AG	1,66	0,68-4,08	0,264	1,89	0,74-4,84	0,185
Dominante						
GG+AG vs. AA	1,13	0,77-1,67	0,536	0,98	0,65-1,48	0,929
Recesivo						
GG vs. AA+AG	1,72	0,73-4,04	0,213	1,72	0,71-4,16	0,231
Sobredominante						
AG vs. GG+AA	1,01	0,67-1,50	0,978	0,86	0,56-1,31	0,483
Alélico						
G vs. A	1,18	0,85-1,63	0,317	1,07	0,77-1,49	0,690

[a]Análisis ajustado por edad.

La influencia del polimorfismo en el desarrollo del cáncer de próstata en función de las variables de estratificación se plasma en la Tabla 30. No se obtiene suficiente evidencia estadística al valorar la influencia conjunta de la edad y el genotipo en el inicio del PCa. No obstante, el efecto diferencial de los genotipos en el desarrollo de la enfermedad parece ponerse más de manifiesto en aquellos individuos con una edad comprendida entre los 65 y los 69 años.

El tabaquismo parece tener una influencia baja en el efecto diferencial que las variantes del rs1049216 ejercen sobre el desarrollo de cáncer de próstata, en tanto que el mayor impacto se obtiene en personas no fumadoras o que presentan un consumo bajo (≤20 *pack-years*). Los individuos que pertenecen a esta categoría y son portadores de dos alelos G presentan un riesgo incrementado de padecer PCa en comparación con los individuos AA (OR= 3,61; *p*= 0,044). Aunque en la comparación AG vs. AA la OR no ha resultado significativa, el modelo alélico (OR= 1,71; *p*= 0,018) revela un mayor riesgo de los individuos que portan en su genoma el alelo G en comparación con el A.

En relación al índice de masa corporal, el mayor riesgo de cáncer de próstata se ha asociado a varones con un IMC alrededor del sobrepeso (24,01-30,99) cuyo genotipo es GG frente a los portadores del genotipo AA, con un incremento en el riesgo hasta cuatro veces superior (OR= 4,43; *p*= 0,040). Esta susceptibilidad se reduce a la mitad si son portadores del genotipo AG (OR= 2,00; *p*= 0,022). En el modelo alélico también se obtienen resultados estadísticamente significativos, de modo que los sujetos portadores del alelo G manifiestan el doble de riesgo a padecer la enfermedad con respecto de aquellos con la variante alélica A (OR= 2,09; *p*= 0,003).

Hasta el momento no se ha descrito una asociación funcional de este marcador con el riesgo de cáncer. No obstante, el rs1049216 está situado en la región 3´UTR, la cual puede ser un sitio de unión para determinados factores de transcripción, de modo que el cambio nucleotídico de A por G en esta zona podría afectar a la actividad transcripcional del gen *CASP3* y, por lo tanto, podría influír en su expresión génica. Ante un daño genotóxico causado por las adipokinas proinflamatorias, el efecto diferencial de las variantes podría salir a la luz. Teniendo en cuenta que la caspasa-3 desempeña un papel crucial como proteasa ejecutora de los cambios morfológicos de la apoptosis, el cambio nucleotídico podría desembocar en la proliferación tumoral al producirse una disminución de la capacidad apoptótica de la proteína, contribuyendo al desarrollo del cáncer de próstata.

Tabla 30. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	AA	56	32	AG vs. AA	1,03	0,53-1,98	0,933
<65	AG	45	25	GG vs. AA	1,33	0,32-5,54	0,691
	GG	7	3				
	AA	36	24	AG vs. AA	1,14	0,49-2,65	0,755
65-69	AG	24	14	GG vs. AA	2,33	0,46-11,91	0,305
	GG	7	2				
	AA	48	61	AG vs. AA	0,74	0,35-1,59	0,439
≥70	AG	14	24	GG vs. AA	1,27	0,24-6,61	0,775
	GG	3	3				
Tabaquismo (PY)							
	AA	40	39	AG vs. AA	1,55	0,73-0,28	0,252
No fumadores	AG	27	17	GG vs. AA	2,93	0,59-14,61	0,188
	GG	6	2				
	AA	99	77	AG vs. AA	0,95	0,58-1,56	0,841
Fumadores	AG	55	45	GG vs. AA	1,30	0,45-3,72	0,629
	GG	10	6				
	AA	69	68	AG vs. AA	1,56	0,89-2,73	0,120
≤20	AG	49	31	GG vs. AA	3,61	1,03-12,67	**0,044**
	GG	11	3				
	AA	35	15	AG vs. AA	0,43	0,17-1,11	0,080
20,01-40,99	AG	14	14	GG vs. AA	0,43	0,08-2,32	0,322
	GG	3	3				
	AA	35	33	AG vs. AA	1,05	0,47-2,38	0,899
≥41	AG	19	17	GG vs. AA	0,94	0,12-7,18	0,954
	GG	2	2				
IMC							
	AA	16	7	AG vs. AA	1,31	0,31-5,63	0,711
≤24	AG	12	4	GG vs. AA	0,24	0,02-2,70	0,236
	GG	0	1				
	AA	84	62	AG vs. AA	2,00	1,11-3,63	**0,022**
24,01-30,99	AG	57	21	GG vs. AA	4,43	1,07-18,38	**0,040**
	GG	12	2				
	AA	29	19	AG vs. AA	0,47	0,19-1,19	0,108
≥31	AG	13	18	GG vs. AA	0,66	0,12-3,62	0,624
	GG	3	3				

El análisis de asociación del polimorfismo con la carcinogénesis prostática valorando la interacción entre las tres variables de estudio se detalla en la Tabla 31.

Se obtiene un máximo impacto al considerar la influencia conjunta del tabaquismo y el índice de masa corporal. Así, en los individuos no fumadores o consumidores de una cantidad baja de tabaco (≤20 py) y con un IMC que ronda el sobrepeso (24,01-30,99), portar el genotipo GG implica un aumento significativamente mayor de padecer cáncer de próstata con respecto de portar el genotipo AA (OR= 7,61; *p*= 0,031). Aunque en la comparación AG vs. AA no se obtienen resultados estadísticamente significativos, en el modelo alélico se observa una mayor predisposición para los sujetos portadores del alelo G en referencia a aquellos con la variante A (OR= 2,25; *p*= 0,008).

Tabla 31. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD 65-69 &	AA	17	15	AG vs. AA	1,91	0,58-6,32	0,283
PY ≤20	AG	13	6	GG vs. AA	5,33	0,67-42,37	0,109
	GG	5	0				
EDAD 65-69 &	AA	23	11	AG vs. AA	1,15	0,32-4,12	0,831
IMC 24,01-30,99	AG	12	5	GG vs. AA	3,00	0,34-26,28	0,315
	GG	5	0				
PY ≤20 &	AA	41	39	AG vs. AA	2,02	0,97-4,22	0,060
IMC 24,01-30,99	AG	34	16	GG vs. AA	7,61	1,19-48,82	**0,031**
	GG	8	1				

5.4.2. rs4647603 (*CASP3*).

La distribución de frecuencias genéticas en nuestra población desvela que el alelo T es el minoritario, con una frecuencia de 0,176 en el grupo de casos y de 0,170 en el de controles (Tabla 32). Estas frecuencias no resultan estadísticamente significativas tras la aplicación del estadístico t_s (p= 0,833). Se trata, por lo tanto, de un marcador poco polimórfico, con valores de heterocigosidad inferiores al 30%. Las frecuencias descritas para el alelo T en nuestro estudio son coherentes con lo descrito en otras poblaciones europeas (0,110-0,210*) (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Las frecuencias genotípicas en el grupo de controles no muestran diferencias significativas con lo esperado en una situación de equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 0,616; p= 0,450).

Tabla 32. Distribución genotípica y alélica del rs4647603 (*CASP3*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
CC	161 (66,53)	130 (68,06)	C	0,824 ± 0,017	0,830 ± 0,019
CT	77 (31,82)	57 (29,84)	T	0,176 ± 0,017	0,170 ± 0,019
TT	17 (6,99)	4 (2,09)			
$\hat{h}$				0,291 ± 0,032	0,284 ± 0,036
Eq. H-W x^2 (p)	0,616 (0,450)				
Estadístico t_s (p)				0,211 (0,833)	

En la Tabla 33 se muestra el análisis de asociación del rs4647603 con el cáncer de próstata a nivel global. No se encuentra asociación estadísticamente significativa del polimorfismo con la enfermedad bajo ningún modelo genético, con valores de *Odds Ratio* muy próximos a 1.

En la comparación de genotipos se observa un ligero aumento en el riesgo para los individuos portadores del genotipo CT en comparación con aquellos CC (OR= 1,09). Aunque en la comparación TT vs. CC se obtiene cierto efecto protector para el genotipo homocigoto TT (OR= 0,81), cuando se comparan conjuntamente los genotipos portadores del alelo T se observa un aumento muy leve en la predisposición con respecto de los portadores del alelo C (OR= 1,04).

Aunque no se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y el carcinoma de cabeza y cuello (Chen *et al*., 2008), sí parece tener un cierto efecto en el riesgo de PCa (Mittal *et al*., 2012). Sin embargo, en dicho estudio (llevado a cabo en población de Lucknow (Norte de la India)), se describe el alelo C como un factor de riesgo para el inicio del cáncer de próstata. Por lo tanto, los resultados parecen entrar en contradicción con lo encontrado en este estudio. Las discrepancias entre ambos estudios, incluso tratándose del mismo órgano, podrían ser el resultado de diferencias genéticas entre las poblaciones de estudio, así como de distintas interacciones gen-ambiente.

Tabla 33. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*P*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
TT vs. CC	0,81	0,20-3,29	0,765	0,88	0,19-4,06	0,866
CT vs. CC	1,09	0,72-1,65	0,680	1,11	0,72-1,70	0,638
TT vs. CT	0,74	0,18-3,09	0,679	0,78	0,17-3,49	0,741
Dominante						
TT+CT vs. CC	1,07	0,71-1,61	0,736	1,09	0,72-1,67	0,683
Recesivo						
TT vs. CC+CT	0,79	0,19-3,18	0,735	0,84	0,19-3,74	0,819
Sobredominante						
CT vs. CC+TT	1,10	0,73-1,66	0,659	1,11	0,72-1,71	0,631
Alélico						
T vs. C	1,04	0,73-1,48	0,833	1,06	0,72-1,57	0,750

[a]Análisis ajustado por edad.

La asociación del rs4647603 con el cáncer de próstata estratificando la muestra en función de las variables de estudio se muestra en la Tabla 34. Dada la proximidad de todos los modelos genéticos a un OR de 1, la interpretación de los resultados se ha basado en el modelo codominante, en el que se comparan los genotipos individuales. Se ha realizado, además, un análisis con el modelo de herencia alélico para evitar la ausencia de individuos TT en muchos grupos.

No se observan resultados estadísticamente significativos al estratificar la muestra por edad. Sin embargo, se obtiene un impacto máximo del genotipo TT ($OR_{TT/CC}$= 3,01) en los individuos jóvenes (<65 años).

En el caso del IMC, se han encontrado diferencias significativas en individuos obesos (IMC ≥31). Se observa que los individuos portadores del genotipo CT muestran un riesgo cuatro veces superior de padecer PCa que aquellos con el genotipo CC (OR= 4,30; *p*= 0,003). En la comparación de genotipos TT y CC se observa el mismo patrón (OR= 2,83), aunque no se alcanza la significación estadística. En el modelo alélico también se observa un riesgo significativamente incrementado para portadores de la variante alélica T (OR= 3,58; *p*= 0,004).

Parece observarse, además, que a medida que aumenta el IMC hay una correlación con el incremento progresivo del riesgo que confiere, tanto el genotipo CT como el alelo T (Fig. 71). Así, por ejemplo, con un IMC mayor o igual a 33 encontramos que los individuos portadores del genotipo CT muestran un riesgo siete veces superior de padecer PCa que aquellos homocigotos CC (OR= 7,00; *p*= 0,014). En la comparación alélica se confirma que los individuos que llevan en su genoma el alelo T muestran una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, desvelándose un *Odds Ratio* de 5,00 (*p*= 0,029).

Estos resultados son muy relevantes si consideramos que más del 30% de la muestra de controles son portadores del alelo T y más del 24% (Aranceta-Bartrina, Pérez-Rodrigo, Alberdi-Aresti, Ramos-Carrera & Lázaro-Masedo, 2016) de la población de Galicia muestra algún grado de obesidad.

Por lo tanto, aunque a nivel global los resultados son apenas reseñables, al analizar la interacción de este polimorfismo con el índice de masa corporal, el efecto diferencial de las variantes se pone de manifiesto, ejerciendo el alelo T un efecto de riesgo en los varones con obesidad. Puesto que el rs4647603 está localizado en la región 5´UTR, la variante molecular T podría implicar una menor actividad transcripcional del gen *CASP3* y, por lo tanto, una menor eficacia apoptótica ante un estrés celular causado por las adipokinas proinflamatorias, lo cual potencialmente podría reducir la protección contra el desarrollo de PCa. Sin embargo, no existe hasta el momento suficiente información disponible en cuanto a la relación entre la estructura molecular del alelo T y el riesgo de PCa que apoye esta posibilidad.

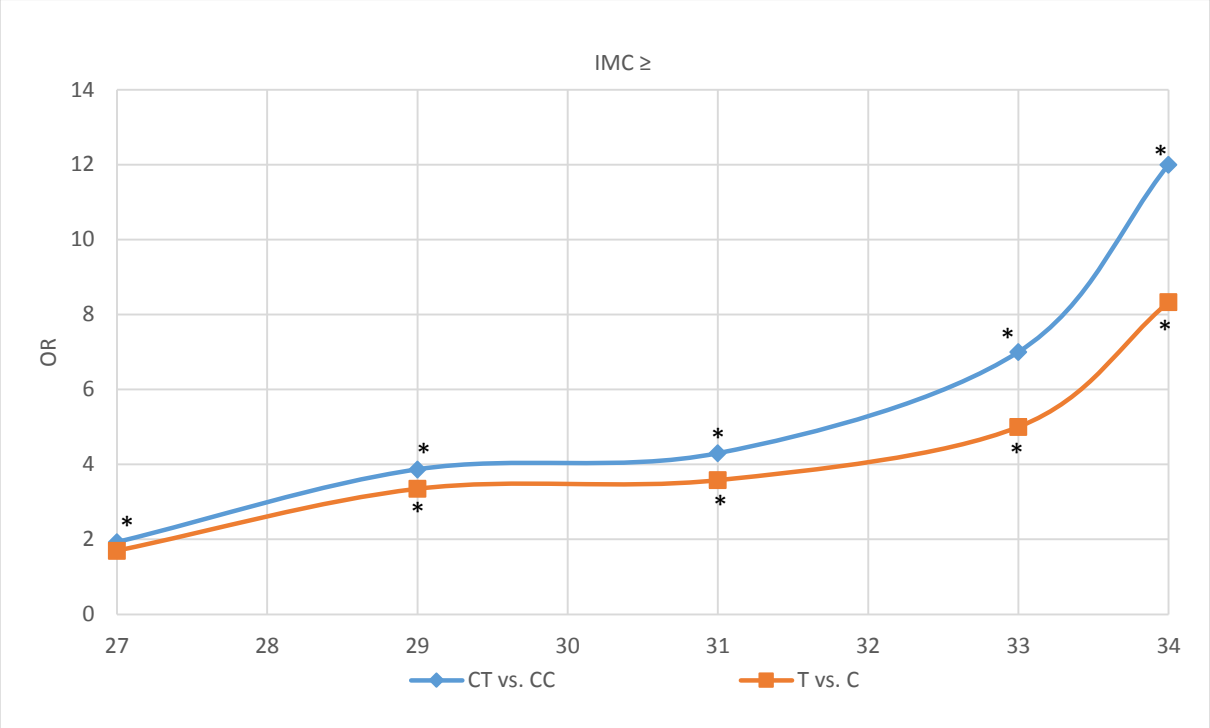

Figura 71. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (*CASP3*-rs4647603). *Valores estadísticamente significativos usando un test x^2 (p<0,05).

Tabla 34. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	CC	67	40	CT vs. CC	1,10	0,56-2,16	0,771
<65	CT	37	20	TT vs. CC	3,01	0,37-24,47	0,299
	TT	4	0				
	CC	51	31	CT vs. CC	1,08	0,42-2,75	0,870
65-69	CT	16	9	TT vs. CC	0,62	0,04-10,09	0,732
	TT	0	0				
	CC	40	58	CT vs. CC	1,34	0,67-2,66	0,404
≥70	CT	24	26	TT vs. CC	0,29	0,04-2,29	0,237
	TT	0	4				
Tabaquismo (PY)							
	CC	45	40	CT vs. CC	1,33	0,64-2,78	0,441
No fumadores	CT	27	18	TT vs. CC	0,89	0,05-14,92	0,936
	TT	0	0				
	CC	111	87	CT vs. CC	1,04	0,62-1,73	0,886
Fumadores	CT	49	37	TT vs. CC	0,78	0,19-3,22	0,735
	TT	4	4				
	CC	85	68	CT vs. CC	0,98	0,55-1,72	0,930
≤20	CT	39	32	TT vs. CC	1,60	0,29-8,92	0,591
	TT	4	2				
	CC	35	21	CT vs. CC	0,93	0,36-2,37	0,874
20,01-40,99	CT	17	11	TT vs. CC	0,61	0,04-10,25	0,730
	TT	0	0				
	CC	36	38	CT vs. CC	1,76	0,75-4,11	0,190
≥41	CT	20	12	TT vs. CC	0,35	0,04-3,27	0,355
	TT	0	2				
IMC							
	CC	21	6	CT vs. CC	0,45	0,11-1,86	0,213
≤24	CT	7	5	TT vs. CC	0,16	0,02-1,66	0,119
	TT	0	1				
	CC	105	53	CT vs. CC	0,74	0,42-1,31	0,300
24,01-30,99	CT	44	30	TT vs. CC	0,76	0,12-4,67	0,764
	TT	3	2				
	CC	23	33	CT vs. CC	4,30	1,61-11,48	**0,003**
≥31	CT	21	7	TT vs. CC	2,83	0,26-30,71	0,388
	TT	1	0				

Los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo y el cáncer de próstata valorando la interacción entre las tres variables de estudio se muestran en la Tabla 35.

Los individuos obesos (IMC ≥31) y fumadores que portan el genotipo heterocigoto CT manifiestan un aumento significativo en el riesgo a desarrollar la enfermedad con respecto de aquellos con el genotipo CC (OR= 3,89; p= 0,014). En la comparación TT vs. CC se observa la misma tendencia (OR= 3,05), aunque los resultados no alcanzan la significación estadística. En el modelo alélico se revela un aumento en la susceptibilidad para los sujetos que llevan el alelo T en comparación con los portadores de la variante C (OR= 3,44; *p*= 0,012).

Tabla 35. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
IMC ≥31 & EDAD <65	CC	11	13	CT vs. CC	3,25	0,81-13,04	0,092
	CT	11	4	TT vs. CC	2,33	0,19-28,72	0,501
	TT	1	0				
IMC ≥31 & PY >0	CC	18	28	CT vs. CC	3,89	1,30-11,61	**0,014**
	CT	15	6	TT vs. CC	3,05	0,28-33,28	0,355
	TT	1	0				
EDAD <65 & PY >0	CC	49	29	CT vs. CC	0,97	0,43-2,19	0,946
	CT	23	14	TT vs. CC	3,00	0,36-24,82	0,305
	TT	4	0				

5.4.3. rs1049216 - rs2705897 - rs4647603 (*CASP3*).

En este estudio se han analizado tres polimorfismos en el gen *CASP3*, el rs4647603, el rs2705897 y el rs1049219, por lo que se ha llevado a cabo un análisis del desequilibrio de ligamiento para valorar la posibilidad de que éstos no segreguen de forma independiente (Fig. 72). El rs1049216 y el rs2705897 presentan un DL completo (D´= 1,000; r^2= 1,000). De este modo, la variante alélica A en el marcador rs1049216 siempre va ligada a la variante alélica G en el marcador rs2705897. Por este motivo, en el análisis individual de los polimorfismos, solo se presentan los resultados correspondientes a uno de ellos, en este caso el rs1049216. Por el contrario, el desequilibrio de ligamiento que presentan estos dos polimorfismos con el rs4647603 es bajo, con un coeficiente de *Lewontin* relativamente alto (D´= 0,408), pero con escasa correlación (r^2= 0,009), lo que posibilita la existencia de más de dos haplotipos.

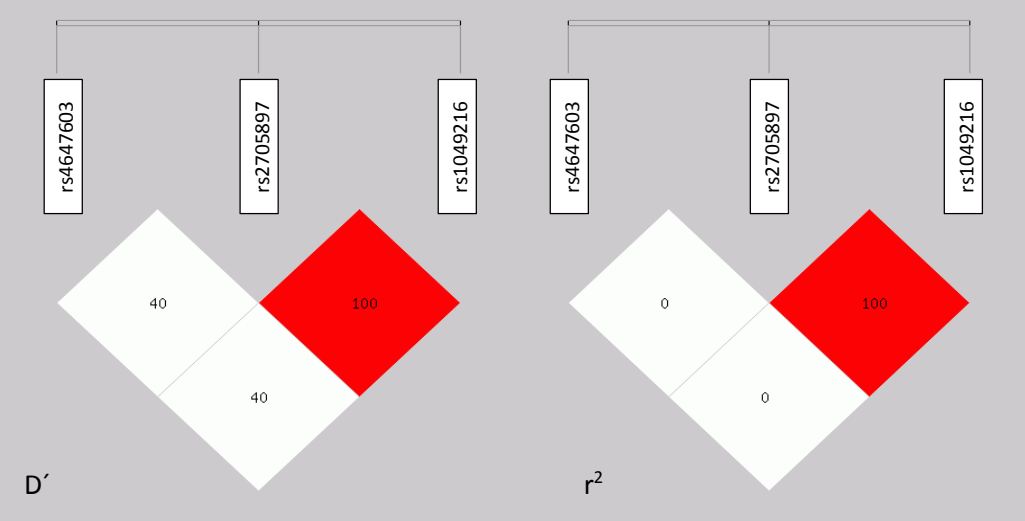

Figura 72. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs4647603, rs2705897 y rs1049216 del *locus CASP3*.

En la Tabla 36 se muestran las frecuencias de los haplotipos formados por los polimorfismos rs1049216-rs2705897 y su asociación con la carcinogénesis prostática. Puesto que existe un desequilibrio de ligamiento completo entre ambos marcadores, solo existen dos haplotipos en nuestra población: A-G y G-T. Aunque no se encuentran resultados estadísticamente significativos, se observa que los individuos portadores del haplotipo G-T parecen manifiestar un aumento en el riesgo de PCa con respecto de aquellos A-G (OR= 1,18).

Tabla 36. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1049216-rs2705897 (*CASP3*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
A-G	0,759	0,788	A-G vs. G-T	0,85	0,62-1,17	0,317
G-T	0,241	0,212	G-T vs. A-G	1,18	0,85-1,63	0,317

[a]Orden de haplotipo: rs1049216A>G-rs2705897G>T.
[b]Haplotipos con una frecuencia inferior a 0,030 quedan excluidos del análisis.

Dada la presencia de un DL completo entre estos dos marcadores, el máximo impacto del alelo T correspondiente al rs2705897 en el cáncer de próstata también será en los varones no fumadores o consumidores de una cantidad de tabaco inferior a 20 py así como en individuos con sobrepeso (IMC= 24,1-30,9). El SNP rs2705897 se sitúa en una región intergénica, concretamente en el sitio donador de *splicing*, de forma que el cambio de la variante alélica G por T podría alterar secuencias consenso de intrones y dar lugar a un variación interindividual de *splicing* del ARNm, posibilitando la creación de una proteína truncada o no funcional.

Las frecuencias de los haplotipos correspondientes a los polimorfismos rs1049216-rs2705897-rs4647603 y su influencia en el desarrollo de la enfermedad se muestran en la Tabla 37. Se encuentran cuatro haplotipos en nuestra población (A-G-C, G-T-C, A-G-T y G-T-T), aunque el G-T-T presenta una frecuencia inferior al 3%, por lo que queda excluido del análisis. Los sujetos con el haplotipo A-G-C, con los tres alelos protectivos, se asocian con el menor riesgo de PCa ($OR_{A\text{-}G\text{-}C/-}$= 0,78), con resultados próximos a la significación estadística (*p*= 0,088).

Tabla 37. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1049216-rs2705897-rs4647603 (*CASP3*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
A-G-C	0,591	0,639	A-G-C vs. G-T-C	0,76	0,54-1,06	0,106
			A-G-C vs. A-G-T	0,82	0,56-1,20	0,314
G-T-C	0,233	0,191	A-G-C vs. -	0,78	0,59-1,04	0,088
A-G-T	0,168	0,149				
			G-T-C vs. A-G-C	1,32	0,94-1,86	0,106
G-T-T[b]	0,008	0,021	G-T-C vs. A-G-T	1,09	0,69-1,71	0,710
			G-T-C vs. -	1,27	0,91-1,77	0,155
			A-G-T vs. A-G-C	1,22	0,83-1,78	0,314
			A-G-T vs.G-T-C	0,92	0,59-1,44	0,710
			A-G-T vs. -	1,13	0,78-1,64	0,513

[a]Orden de haplotipo: rs1049216A>G-rs2705897G>T-rs4647603C>T.
[b]Haplotipos con una frecuencia inferior a 0,030 quedan excluidos del análisis.

En la Tabla 38 se presentan las frecuencias de las combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos del gen *CASP3* (rs1049216-rs2705897-rs4647603) así como su influencia en el desarrollo del cáncer de próstata.

La existencia de un desequilibrio de ligamiento completo entre los marcadores rs1049216 y rs2705897 determina que los genotipos AA, AG y GG del primero solo aparezcan en combinación con los genotipos GG, GT y TT del segundo, respectivamente. Al mismo tiempo, este hecho condiciona que de las 27 combinaciones genotípicas posibles entre los tres polimorfismos solamente se puedan encontrar 9. En nuestra población no se encuentran individuos con las combinaciones AG-GT-TT o GG-TT-TT, por lo que quedan excluidas del

análisis. No se encuentra asociación estadísticamente significativa con la enfermedad en ninguna de las comparaciones genotípicas.

Tabla 38. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs1049216-rs2705897-rs4647603 (*CASP3*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*p*
AA-GG-CC	89 (36,78)	80 (41,88)	AA-GG-CC vs. -	0,81	0,55-1,19	0,279
AA-GG-CT	49 (20,25)	34 (17,80)	AA-GG-CT vs. -	1,17	0,72-1,91	0,521
AA-GG-TT	4 (1,65)	4 (2,09)	AA-GG-TT vs. -	0,79	0,19-3,18	0,735
AG-GT-CC	56 (23,14)	43 (22,51)	AG-GT-CC vs. -	1,04	0,66-1,63	0,877
AG-GT-CT	27 (11,16)	22 (11,52)	AG-GT-CT vs. -	0,96	0,53-1,76	0,906
AG-GT-TT[b]	0 (0)	0 (0)	GG-TT-CC vs. -	1,86	0,76-4,57	0,175
GG-TT-CC	16 (6,61)	7 (3,66)	GG-TT-CT vs. -	0,79	0,05-12,65	0,866
GG-TT-CT	1 (0,41)	1 (0,52)				
GG-TT-TT[b]	0 (0)	0 (0)				

[a]Orden de combinación genotípica: rs1049216A>G-rs2705897G>T-rs4647603C>T.
[b]Combinaciones genotípicas excluidas del análisis.

La ausencia de asociación con el cáncer de próstata que se observa al analizar conjuntamente el efecto de los genotipos correspondientes a los polimorfismos del gen *CASP3* puede explicarse de diversas maneras. Por una parte, al realizar dichas combinaciones genotípicas se produce una fragmentación importante de la muestra, lo que deriva en una reducción del tamaño muestral en las diferentes categorías. Como consecuencia, dado el carácter conservativo del estadístico *chi* cuadrado, los resultados obtenidos pueden no alcanzar valores significativos incluso en los casos que presentan OR relativamente elevados.

Por otra parte, el análisis de combinaciones genotípicas se ha llevado a cabo utilizando datos procedentes de la muestra global para evitar fragmentar más la muestra. No obstante, en el análisis individual de los polimorfismos, el máximo impacto de las diferentes variantes genotípicas se obtenía al estratificar la muestra en función de las tres variables de estudio (edad, tabaquismo e IMC), no en el análisis global. Para cada marcador, la máxima susceptibilidad se observaba en diferentes intervalos de la estratificación, por lo que al valorar conjuntamente estos polimorfismos podrían producirse fenómenos de compensación.

5.4.4. rs11196418 (*CASP7*).

En la Tabla 39 se detalla la distribución genotípica y alélica del rs11196418 en nuestra población de estudio. Las frecuencias genotípicas en la muestra de controles están en concordancia con lo esperado en situación de equilibrio genético (χ^2= 0,166; *p*= 0,675). El alelo menos frecuente en nuestra población es el A (0,139 en casos y 0,145 en controles). Esta frecuencia es similar a la descrita en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,130-0,210) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Las diferencias entre las frecuencias alélicas de casos y controles no son estadísticamente significativas (t_s= 0,276; *p*= 0,782). La diversidad genética de este polimorfismo es baja tanto en la muestra de casos (0,240) como de controles (0,248).

Tabla 39. Distribución genotípica y alélica del rs11196418 (*CASP7*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
GG	196 (73,41)	183 (73,49)	G	0,861 ± 0,015	0,855 ± 0,016
AG	68 (25,47)	60 (24,10)	A	0,139 ± 0,015	0,145 ± 0,016
AA	3 (1,12)	6 (2,41)			
$\hat{h}$				0,240 ± 0,031	0,248 ± 0,032
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,166 (0,675)				
Estadístico t_s (*p*)				0,276 (0,782)	

La influencia de este polimorfismo en el cáncer de próstata a nivel global se muestra en la Tabla 40. Se encuentra una coherencia entre todos los modelos genéticos, con el modelo codominante y, especialmente el dominante, aportando la máxima información acerca del comportamiento de este marcador.

En el modelo codominante se observa que los individuos portadores del genotipo homocigoto GG manifiestan el doble de riesgo de padecer PCa que aquellos con el genotipo AA (OR= 2,14). Así mismo, los varones con el genotipo heterocigoto AG también presentan un aumento en la susceptibilidad dos veces superior en referencia a los portadores de AA (OR= 2,27). En la comparación GG vs. AG se obtiene un valor muy próximo a la neutralidad, ejerciendo ambos genotipos una influencia similar sobre la carcinogénesis.

El comportamiento de este marcador se ajustaría, por lo tanto, a un modelo de dominancia, con los individuos portadores del alelo G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentando una predisposición al PCa notablemente superior que aquellos portadores del alelo A en homocigosis ($OR_{GG+AG/AA}$= 2,17).

A pesar de que se obtienen OR elevados, el bajo número de individuos con el genotipo AA, el que presenta el máximo efecto protector, condiciona que los valores de *p* no alcancen la significación estadística. Aun así, la realidad biológica apunta claramente a un alelo G de riesgo y un alelo A protectivo. Es decir, basta con portar una copia del alelo G para tener una mayor predisposición al cáncer de próstata.

En este estudio se analiza por primera vez la relación del rs11196418 con el cáncer en población Caucasoide. El trabajo llevado a cabo en población china por Xu y colaboradores (2009) en carcinoma endometrial coincide con nuestros resultados, encontrando un efecto protector para el genotipo AA ($OR_{AA/GG}$= 0,36), un resultado muy similar al descrito en esta población ($OR_{AA/GG}$= 0,47).

Hasta el momento no se ha desvelado ninguna implicación funcional de este polimorfismo, aunque su posición en la región promotora del gen *CASP7* nos indica que el cambio de una variante alélica por otra (G>A) podría afectar al sitio de unión a algún factor de transcripción, conduciendo a una expresión génica diferencial. La caspasa-7 presenta un papel análogo a la caspasa-3 en el desmantelamiento celular, por lo que el cambio de un alelo por otro en la región promotora podría conducir a una capacidad apoptótica reducida, favoreciendo la proliferación de células potencialmente cancerígena.

Tabla 40. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	2,14	0,54-8,44	0,276	2,15	0,53-8,77	0,285
AG vs. AA	2,27	0,56-9,21	0,251	2,39	0,57-10,08	0,235
GG vs. AG	0,95	0,63-1,41	0,782	0,91	0,60-1,37	0,649
Dominante						
GG+AG vs. AA	2,17	0,55-8,51	0,265	2,20	0,54-8,95	0,269
Recesivo						
GG vs. AA+AG	1,00	0,67-1,47	0,982	0,96	0,65-1,43	0,874
Sobredominante						
AG vs. GG+AA	1,08	0,72-1,61	0,718	1,12	0,75-1,69	0,585
Alélico						
G vs. A	1,05	0,74-1,49	0,782	1,02	0,71-1,47	0,890

[a]Análisis ajustado por edad.

El análisis del polimorfismo estratificando la muestra en función de las distintas variables de estudio se muestra en la Tabla 41.

Al valorar la interacción conjunta de la edad y el genotipo en la carcinogénesis no se encuentra asociación significativa. Sin embargo, el efecto de riesgo de los genotipos GG y AG es más acentuado en personas con una edad igual o superior a 59 años (OR= 3,38).

En lo que respecta al índice de masa corporal, la mayor predisposición al PCa asociada con el alelo G parece ponerse más de manifiesto en personas con obesidad (≥31), aunque no se obtiene evidencia estadística suficiente (OR= 4,00).

No es, sino, en el tabaquismo, donde se ve más claramente el efecto diferencial de las variantes, obteniendo resultados de alto impacto y estadísticamente significativos. De este modo, los individuos fumadores portadores del alelo G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentan 5 veces más riesgo de padecer cáncer de próstata que aquellos con el genotipo AA (OR= 5,61). El efecto de riesgo de los genotipos GG y AG se manifiesta

especialmente en los sujetos fumadores de una cantidad moderada de tabaco (hasta 35 *pack-years*), alcanzando una susceptibilidad hasta 8 veces superior que aquellos con el genotipo AA (OR= 8,13; *p*= 0,024).

El tabaquismo puede favorecer la liberación de especies reactivas de oxígeno y la formación de aductos en el ADN. En este sentido, una ejecución correcta de la muerte celular programada es vital para prevenir la proliferación de células con tales daños que podrían conducir a un cáncer. Personas sometidas a un estrés generado por los carcinógenos del tabaco precisarían de un correcto funcionamiento de la proteína caspasa-7. Aquellas que llevan en el genoma el alelo G del rs11196418 podrían no tener suficiente cantidad de esta proteína, debido a una menor expresión génica, lo que supondría una capacidad apoptótica inferior y una probabilidad incrementada de desarrollar un carcinoma. El mayor efecto protector del genotipo AA se encuentra en los varones consumidores de una cantidad moderada de tabaco. En rangos elevados los carcinógenos del tabaco podrían ocasionar daños genotóxicos en un elevado número de células, de modo que ninguna de las variantes de este SNP podría ser lo suficientemente eficaz como para garantizar su eliminación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 41. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	GG	39	39	GG vs. AA	0,50	0,04-5,57	0,571
<59	AG	7	10	AG vs. AA	0,36	0,03-4,69	0,427
	AA	1	0	GG+AG vs. AA	0,47	0,04-5,15	0,535
	GG	156	143	GG vs. AA	3,27	0,71-15,17	0,129
≥59	AG	59	48	AG vs. AA	3,69	0,78-17,53	0,099
	AA	2	6	GG+AG vs. AA	3,38	0,74-15,49	0,117
Tabaquismo (PY)							
	GG	55	60	GG vs. AA	0,46	0,04-4,96	0,519
No fumadores	AG	20	15	AG vs. AA	0,67	0,05-8,22	0,748
	AA	2	1	GG+AG vs. AA	0,69	0,05-5,43	0,568
	GG	138	121	GG vs. AA	5,70	0,83-39,11	0,076
Fumadores	AG	45	42	AG vs. AA	5,36	0,73-39,23	0,097
	AA	1	5	GG+AG vs. AA	5,61	0,82-38,39	0,078
	GG	81	58	GG vs. AA	8,34	1,34-51,84	**0,022**
>0-<35	AG	24	19	AG vs. AA	7,50	1,05-53,40	**0,042**
	AA	0	5	GG+AG vs. AA	8,13	1,32-50,15	**0,024**
	GG	57	63	GG vs. AA	0,45	0,04-4,89	0,512
≥35	AG	21	23	AG vs. AA	0,46	0,04-5,27	0,527
	AA	1	0	GG+AG vs. AA	0,45	0,04-4,85	0,513
IMC							
	GG	148	113	GG vs. AA	1,31	0,18-9,42	0,788
<31	AG	49	26	AG vs. AA	1,88	0,25-13,94	0,532
	AA	2	2	GG+AG vs. AA	1,42	0,20-10,11	0,728
	GG	35	34	GG vs. AA	4,12	0,50-33,77	0,184
≥31	AG	14	15	AG vs. AA	3,73	0,40-34,67	0,240
	AA	1	4	GG+AG vs. AA	4,00	0,50-32,20	0,190

La influencia del polimorfismo en el desarrollo del PCa valorando la interacción entre las distintas variables de estudio se muestra en la Tabla 42.

El efecto del tabaquismo cobra relevancia, especialmente, en los varones con una edad igual o superior a los 59 años. Bajo estas condiciones del entorno celular, el efecto de riesgo del genotipo GG llega a ser hasta 9 veces superior que el del genotipo AA (OR= 9,15; *p*= 0,017) y se alcanza una susceptibilidad diez veces mayor para los sujetos portadores del genotipo heterocigoto en comparación con aquellos con el homocigoto AA (OR= 10,00; *p*= 0,018).

Tabla 42. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD ≥59 & PY >0-<35	GG	60	39	GG vs. AA	9,15	1,47-56,87	**0,017**
	AG	24	14	AG vs. AA	10,00	1,46-68,70	**0,018**
	AA	0	5	GG+AG vs. AA	9,38	1,56-56,57	**0,014**
EDAD ≥59 & IMC ≥31	GG	28	26	GG vs. AA	5,37	0,71-40,90	0,102
	AG	13	10	AG vs. AA	6,36	0,76-53,53	0,083
	AA	0	4	GG+AG vs. AA	5,66	0,78-41,16	0,085
PY >0-<35 & IMC ≥31	GG	14	12	GG vs. AA	4,62	0,51-41,66	0,166
	AG	6	4	AG vs. AA	5,60	0,50-62,50	0,149
	AA	0	3	GG+AG vs. AA	4,89	0,58-41,18	0,140

5.5. *FAS-FASLG.*

5.5.1. rs1800682 (*FAS*).

El estudio de las frecuencias genéticas del rs1800682 en nuestra población permite desvelar un grado de polimorfismo elevado para este marcador, con una heterocigosidad esperada cercana al 50% (Tabla 43). Así, aunque el alelo G se erige como la variante minoritaria, con una frecuencia de 0,454 en casos y 0,424 en controles, la distribución de ambos alelos en nuestra población es similar. Igual que en nuestro estudio, la variante G también es la menos frecuente en otras poblaciones europeas, con valores que oscilan entre 0,380 y 0,470 (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Por otra parte, las frecuencias genotípicas descritas en la muestra de controles no presentan diferencias con lo esperado en situación de equilibrio genético (χ^2= 0,031; *p*= 0,850).

Tabla 43. Distribución genotípica y alélica del rs1800682 (*FAS*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	78 (31,20)	66 (33,50)	A	0,546 ± 0,022	0,576 ± 0,025
AG	117 (46,80)	95 (48,22)	G	0,454 ± 0,022	0,424 ± 0,025
GG	55 (22,00)	36 (18,27)			
$\hat{h}$				0,498 ± 0,006	0,491 ± 0,011
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,031 (0,850)				
Estadístico t_s (*p*)				0,902 (0,367)	

Los resultados del análisis de asociación entre el rs1800682 y el cáncer de próstata se muestran en la Tabla 44. A pesar de que no se obtiene suficiente evidencia estadística y los valores de OR son de bajo impacto, se detectan ciertas tendencias. De este modo, se observa una coherencia entre todos los modelos genéticos, los cuales apuntan a un alelo A protectivo y un alelo G de riesgo, encontrando la máxima susceptibilidad para los sujetos con el genotipo homocigoto GG.

Apoyando nuestros resultados, en la mayoría de estudios se ha vinculado el alelo G de este polimorfismo con un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer. Tal es el caso del carcinoma de tiroides (Eun *et al*., 2015), de cabeza y cuello (Zhang *et al*., 2006), de mama (Nallapalle *et al*., 2015), de cérvix (Tan *et al*., 2017), de colon y recto (Wang *et al*., 2016), así como el mioma uterino (Mohammadpour-Gharehbagh *et al*., 2016) o la leucemia mieloide (Edathara *et al*., 2016).

Por lo que respecta al carcinoma prostático, los resultados encontrados en otros estudios son aparentemente contradictorios con lo descrito en nuestra población, desvelando un efecto protector del alelo G, tanto a nivel global (Shao *et al*., 2011) como frente al PCa avanzado (Lima *et al*., 2008).

Tabla 44. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	1,29	0,76-2,20	0,345	1,41	0,80-2,48	0,240
GG vs. AG	1,24	0,75-2,05	0,398	1,34	0,80-2,25	0,274
AA vs. AG	1,04	0,68-1,60	0,849	1,02	0,66-1,58	0,935
Dominante						
GG+AG vs. AA	1,11	0,75-1,66	0,605	1,11	0,74-1,68	0,616
Recesivo						
GG vs. AA+AG	1,26	0,79-2,02	0,331	1,36	0,83-2,22	0,220
Sobredominante						
GG+AA vs. AG	1,06	0,73-1,54	0,765	1,11	0,75-1,63	0,605
Alélico						
G vs. A	1,13	0,87-1,48	0,367	1,15	0,88-1,51	0,310

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 45 se muestra la relación del rs1800682 con el cáncer de próstata estratificando en función de las tres variables de estudio. Aunque a nivel global los datos si acaso indican un efecto de riesgo para el alelo G y protector para el A, al valorar la interacción de este marcador con las variables de estratificación el efecto diferencial de tales variantes sale a la luz.

Cuando se examina la interacción con la variable edad, es en los individuos con una edad comprendida entre los 65 y los 69 años en donde más se manifiesta la diferencia entre las distintas variantes de este SNP, obteniendo resultados estadísticamente significativos. Así, en el modelo alélico (datos no mostrados), se obtiene que los individuos con la variante alélica G muestran un riesgo un 75% superior que los individuos con la variante alélica A (OR= 1,75; *p*= 0,045). En este intervalo de edad, el riesgo de los varones con el genotipo GG llega a ser hasta 7 veces superior que el de aquellos que llevan en el genoma el alelo A, tanto en homocigosis (OR= 7,00; *p*= 0,010) como en heterocigosis (OR= 7,88; *p*= 0,003).

En cuanto al tabaquismo, se encuentra asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y la enfermedad en aquellos individuos consumidores de una cantidad muy alta de tabaco (≥40 py). El tabaquismo parece tener, por lo tanto, una gran relevancia en el efecto diferencial que las variantes de este SNP ejercen frente al cáncer de próstata, en tanto que los sujetos con un consumo excesivo portadores del alelo G presentan un 76% más de riesgo frente a este cáncer que aquellos con el alelo A (OR= 1,76; *p*= 0,028) (datos no mostrados). La susceptibilidad se acentúa especialmente en la comparación de genotipos, en tanto que los individuos con el genotipo GG manifiestan un riesgo hasta 3 veces superior que el de aquellos con el genotipo AA (OR= 3,11; *p*= 0,038). Parece haber, en este caso, un efecto dosis-dependiente de modo que la susceptibilidad es mayor al portar dos copias del alelo G (GG) que una copia (AG).

De acuerdo con estos resultados, se ha descrito un notable aumento en el riesgo de carcinoma oral para los individuos con el genotipo AG o GG cuando son fumadores en comparación con aquellos con el mismo genotipo pero no consumidores de tabaco (OR= 4,10 y OR= 10,91, respectivamente) (Wang *et al*., 2010).

Factores como el envejecimiento o el tabaquismo generan un daño genotóxico que debe terminar con la muerte de la célula para evitar la proliferación tumoral. En este ambiente estresante, el efecto de la diferencia en la eficacia funcional de las variantes alélicas de este polimorfismo podría acentuarse. Partimos de la base de que el alelo G de este polimorfismo se ha asociado con una menor expresión del gen FAS en respuesta al INF-ɣ secretado por linfocitos T citotóxicos y células *natural killers* debido a una menor unión con el factor de transcripición STAT1 (Kanemitsu *et al*., 2002) y que los niveles de ARNm de este gen se incrementan gradualmente con el aumento del número de alelos A (Farre *et al*., 2008).

Proporcionando apoyo a nuestros resultados, se ha descrito una menor capacidad apoptótica de células portadoras del genotipo GG (Hu *et al*., 2008) o del alelo G (Wang *et al*., 2003) cuando son sometidas al carcinógeno del tabaco BPDE. Además, linfocitos de sangre periférica (PBLs) pertenecientes a individuos fumadores crónicos desarrollan un aumento en la expresión de FAS (Bijil, Horst, Limburg & Kallenberg, 2001) y FASL (Suzuki, Wakisaka, Takeba, Mihara & Sakane, 1999) en comparación con la expresión en individuos no fumadores. Esto puede resultar en la autodestrucción de linfocitos y contribuir al deterioro del sistema inmune en individuos consumidores de tabaco. En lo que respecta a la edad, se ha visto un aumento en la cantidad de linfocitos T sensibles a FAS (FAS^+) a medida que se produce el envejecimiento en humanos, lo cual también conduce a un incremento de la apoptosis de estas células, contribuyendo igualmente al debilitamiento de la defensa inmunitaria (Pinti *et al*., 2002).

Por lo tanto, el mayor efecto de riesgo de PCa asociado al alelo G, especialmente en homocigosis, en personas de mediana edad o consumidoras de una cantidad elevada de tabaco podría deberse a una disminución de la apoptosis de células con daños en el ADN debido a la evasión de la vigilancia inmunitaria. Este escape inmune vendría originado por un descenso en la expresión del gen FAS en células diana potencialmente cancerígenas portadoras del alelo G y por un aumento en la destrucción de células del sistema inmune inherente al tabaquismo y al envejecimiento.

Con respecto al índice de masa corporal, el polimorfismo parece impactar de manera más diferencial en aquellos individuos con un IMC igual o superior a 32, donde el riesgo de portar el alelo G en homocigosis implicaría un riesgo hasta 5 veces mayor que el de llevar el alelo A. No obstante, cabe destacar, que en este caso no se obtiene suficiente evidencia estadística que ampare tales resultados.

Tabla 45. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	AA	39	21	GG vs. AA	1,13	0,46-2,76	0,795
<65	AG	51	30	GG vs. AG	1,23	0,52-2,88	0,632
	GG	23	11	AG vs. AA	0,92	0,46-1,84	0,803
	AA	18	14	GG vs. AA	7,00	1,56-31,41	**0,010**
65-69	AG	32	28	GG vs. AG	7,88	1,97-31,54	**0,003**
	GG	18	2	AG vs. AA	0,89	0,37-2,12	0,789
	AA	21	30	GG vs. AA	0,84	0,35-2,05	0,707
≥70	AG	32	36	GG vs. AG	0,66	0,29-1,54	0,337
	GG	13	22	AG vs. AA	1,27	0,61-2,65	0,523
Tabaquismo (PY)							
	AA	26	16	GG vs. AA	0,84	0,33-2,13	0,704
No fumadores	AG	29	30	GG vs. AG	1,40	0,59-3,32	0,438
	GG	19	14	AG vs. AA	0,60	0,27-1,33	0,205
	AA	51	48	GG vs. AA	1,52	0,78-2,98	0,218
Fumadores	AG	85	63	GG vs. AG	1,20	0,64-2,27	0,573
	GG	34	21	AG vs. AA	1,27	0,76-2,12	0,360
	AA	39	24	GG vs. AA	1,03	0,42-2,48	0,955
>0-<40	AG	48	35	GG vs. AG	1,22	0,52-2,82	0,648
	GG	20	12	AG vs. AA	0,84	0,43-1,65	0,619
	AA	12	24	GG vs. AA	3,11	1,06-9,16	**0,038**
≥40	AG	37	28	GG vs. AG	1,18	0,44-3,12	0,742
	GG	14	9	AG vs. AA	2,64	1,14-6,14	**0,023**
IMC							
	AA	62	40	GG vs. AA	1,01	0,54-1,89	0,965
<32	AG	89	49	GG vs. AG	0,87	0,48-1,56	0,629
	GG	44	28	AG vs. AA	1,17	0,69-1,99	0,557
	AA	12	9	GG vs. AA	5,25	0,61-45,15	0,124
≥32	AG	18	15	GG vs. AG	5,83	0,76-44,93	0,086
	GG	7	1	AG vs. AA	0,90	0,30-2,74	0,851

Al valorar conjuntamente los factores del entorno celular es en donde se desvela más claramente el efecto de las variantes del rs1800682 en el desarrollo del cáncer de próstata (Tabla 46).

Se encuentra evidencia estadística al examinar la interacción de la edad y el tabaquismo. Así, en los hombres de mediana edad (65-69 años) consumidores de tabaco, llevar el alelo G en homocigosis supone un riesgo hasta 7 veces superior que portar el alelo A. Este efecto se acentúa especialmente en los varones del mismo rango etario pero consumidores de una cantidad muy elevada de tabaco (≥40 py), donde una copia del alelo G es suficiente para incrementar el riesgo de cáncer hasta 6 veces y dos copias de tal variante suponen casi el doble de susceptibilidad, obteniendo un OR de 11,25. Cabe destacar que estos resultados deben ser interpretados con cautela debido al bajo tamaño muestral.

Aunque al valorar la interacción del índice de masa corporal con el polimorfismo de forma individual no se obtenía evidencia estadística, los carcinógenos del tabaco ponen de manifiesto el riesgo de la obesidad (IMC ≥30) frente al desarrollo del cáncer de próstata. En este sentido, los individuos sometidos a estos dos factores estresantes que portan el alelo G en homocigosis presentan un riesgo hasta 8 veces superior que el de aquellos que llevan en el genoma el alelo A de este SNP.

Tabla 46. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD 65-69 & PY >0	AA	10	12	GG vs. AA	7,20	1,42-36,55	**0,016**
	AG	19	16	GG vs. AG	5,05	1,07-23,95	**0,039**
	GG	12	2	AG vs. AA	1,43	0,48-4,19	0,516
EDAD 65-69 & PY ≥40	AA	4	9	GG vs. AA	11,25	1,14-110,54	**0,033**
	AG	9	3	GG vs. AG	1,67	0,13-21,77	0,688
	GG	5	1	AG vs. AA	6,75	1,20-37,97	**0,027**
IMC ≥30 & PY >0	AA	12	17	GG vs. AA	8,50	1,81-39,93	**0,006**
	AG	22	25	GG vs. AG	6,82	1,56-29,79	**0,010**
	GG	12	2	AG vs. AA	1,25	0,49-3,19	0,644
IMC ≥30 & PY ≥40	AA	5	7	GG vs. AA	3,50	0,47-26,20	0,210
	AG	9	8	GG vs. AG	2,22	0,33-15,08	0,404
	GG	5	2	AG vs. AA	1,58	0,35-7,16	0,550

5.5.2. rs3740286 (*FAS*).

En la Tabla 47 se muestra la distribución de alelos y genotipos correspondientes al rs3740286 en la población de estudio. La distribución de frecuencias genotípicas en el grupo de individuos sanos no difieren de lo esperado en equilibrio genético (χ^2= 0,001; *p*= 0,975). El alelo minoritario en nuestra población es el G, con una frecuencia ligeramente superior en controles (0,409) que en casos (0,388), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (t_s= 0,626; *p*= 0,532). La frecuencia del alelo G se encuentra dentro del rango de variación de lo descrito en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,360-0,430) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). El índice de heterocigosidad encontrado para este marcador es elevado, tanto en el grupo de pacientes (0,477) como de individuos sanos (0,486).

Tabla 47. Distribución genotípica y alélica del rs3740286 (*FAS*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	100 (40,00)	69 (35,03)	A	0,612 ± 0,022	0,591 ± 0,025
AG	106 (42,40)	95 (48,22)	G	0,388 ± 0,022	0,409 ± 0,025
GG	44 (17,60)	33 (16,75)			
$\hat{h}$				0,477 ± 0,014	0,486 ± 0,013
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,001 (0,975)				
Estadístico t_s (*p*)				0,626 (0,532)	

La relación del rs3740286 con el desarrollo del cáncer de próstata a nivel global se muestra en la Tabla 48. Aunque los resultados parecen sugerir un efecto de riesgo para el alelo A y protector para el G, no se encuentra asociación estadísticamente significativa en ninguno de los modelos genéticos analizados, con valores de OR apenas reseñables.

Este estudio es el primer trabajo de tipo caso-control que analiza la influencia del rs3740286 en la carcinogénesis, por lo que aporta información inédita acerca de su comportamiento en relación con la enfermedad. Los resultados obtenidos deben ser contrastados con futuros estudios en otros tipos tumorales y en poblaciones de diverso trasfondo genético.

Tabla 48. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*P*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
AA vs. GG	1,09	0,63-1,88	0,765	1,20	0,67-2,12	0,544
AA vs. AG	1,30	0,86-1,96	0,215	1,28	0,83-1,96	0,263
GG vs. AG	1,19	0,70-2,03	0,509	1,09	0,63-1,90	0,750
Dominante						
AA+AG vs. GG	0,94	0,57-1,55	0,813	1,02	0,61-1,72	0,928
Recesivo						
AA vs. GG+AG	1,24	0,84-1,82	0,282	1,25	0,83-1,86	0,282
Sobredominante						
AA+GG vs. AG	1,27	0,87-1,84	0,219	1,22	0,82-1,79	0,327
Alélico						
A vs. G	1,09	0,83-1,43	0,531	1,11	0,85-1,47	0,430

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 49 se muestra la interacción del rs3740286 con el cáncer de próstata estratificando en función de las distintas variables de estudio.

Al valorar la interacción del polimorfismo con la edad se observan resultados estadísticamente significativos en los varones con un rango etario comprendido entre los 65 y los 69 años. Es en este estrato donde la diferencia entre las variantes genotípicas se pone más de manifiesto, de modo que los individuos con el genotipo AA presentan un riesgo casi 3 veces superior de padecer cáncer de próstata que aquellos con el genotipo AG. El aumento en la susceptibilidad para los sujetos con el genotipo AA parece ser similar en referencia a aquellos que portan en su genoma la variante G, tanto en homocigosis como en heterocigosis, encontrandose un OR de 2,51 en el modelo recesivo (p= 0,028).

La obesidad también parece jugar un papel relevante en la influencia que este polimorfismo ejerce sobre la enfermedad ya que los hombres con estos valores de IMC (≥30) y que carecen del alelo G manifiestan un aumento en el riesgo de PCa. De este modo, en los sujetos sometidos a esta presión de adipokinas inflamatorias, portar el genotipo AA supone un riesgo casi 4 veces superior que llevar el genotipo AG, obteniendo resultados claramente significativos.

La evolución del riesgo a desarrollar cáncer de próstata a medida que se incrementa el índice de masa corporal se muestra en la Figura 73. En los hombres con un IMC inferior a 30 no parece apreciarse un efecto diferencial de los genotipos, con valores neutros. Sin embargo, a partir de un IMC igual o superior a 30 los individuos portadores del genotipo AA manifiestan un aumento en la susceptibilidad al PCa, hasta alcanzar un punto máximo en 33, llegando a ser más de 6 veces superior que la predisposición para los individuos AG (OR= 6,12 p= 0,078) o hasta 10 veces mayor que la que presentan los sujetos con el genotipo homocigoto GG (OR= 10,00, p= 0,046).

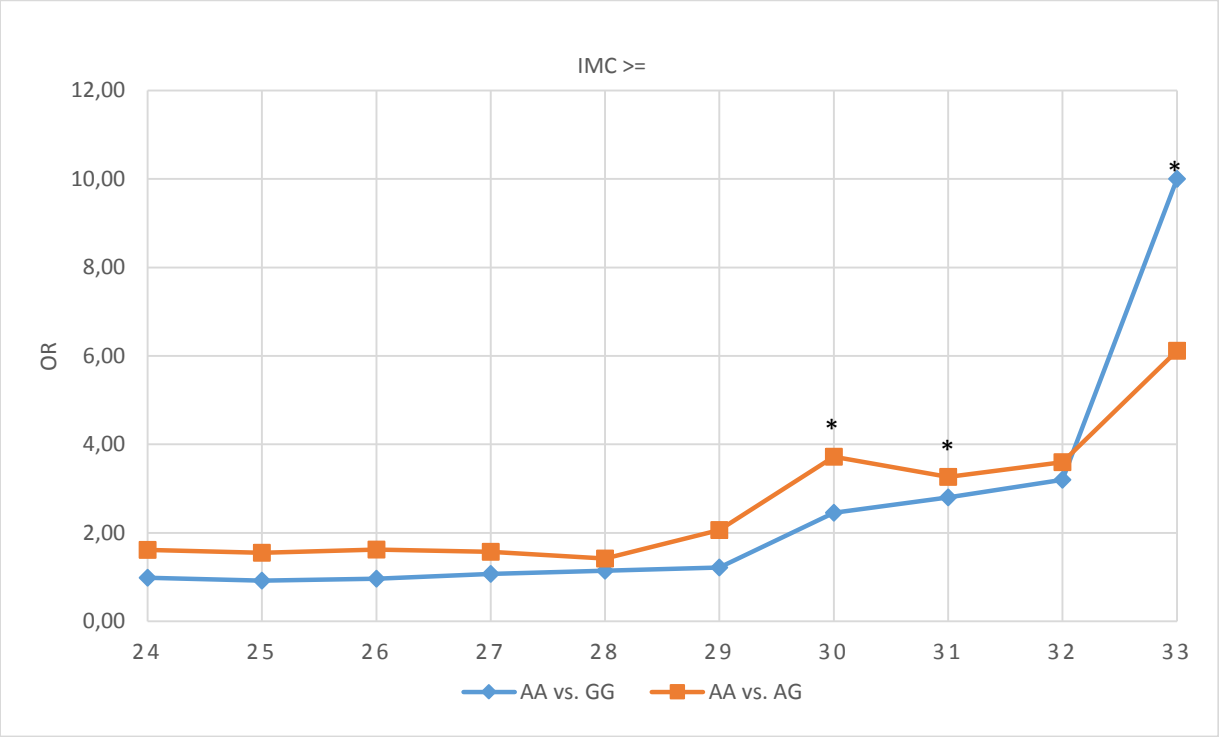

Figura 73. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (*FAS*-rs3740286). *Valores estadísticamente significativos usando un test x^2 (p<0,05).

Tabla 49. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	AA	42	23	AA vs. GG	0,77	0,32-1,85	0,560
<65	AG	45	28	AA vs. AG	1,14	0,57-2,28	0,718
	GG	26	11				
	AA	31	11	AA vs. GG	2,51	0,78-8,06	0,120
65-69	AG	28	25	AA vs. AG	2,52	1,06-6,00	**0,036**
	GG	9	8				
	AA	25	34	AA vs. GG	1,06	0,39-2,89	0,905
≥70	AG	32	41	AA vs. AG	0,94	0,47-1,89	0,866
	GG	9	13				
Tabaquismo (PY)							
	AA	32	27	AA vs. GG	0,40	0,13-1,21	0,102
No fumadores	AG	27	28	AA vs. AG	1,23	0,59-2,57	0,583
	GG	15	5				
	AA	64	41	AA vs. GG	1,40	0,72-2,71	0,317
Fumadores	AG	77	65	AA vs. AG	1,32	0,79-2,20	0,291
	GG	29	26				
	AA	77	56	AA vs. GG	1,03	0,56-1,89	0,921
<50	AG	87	68	AA vs. AG	1,08	0,67-1,72	0,763
	GG	36	27				
	AA	19	12	AA vs. GG	0,79	0,19-3,26	0,744
≥50	AG	17	25	AA vs. AG	2,33	0,90-6,01	0,079
	GG	8	4				
IMC							
	AA	68	36	AA vs. GG	0,89	0,42-1,85	0,745
<30	AG	68	38	AA vs. AG	1,06	0,60-1,86	0,852
	GG	32	15				
	AA	24	8	AA vs. GG	2,45	0,75-8,05	0,135
≥30	AG	29	36	AA vs. AG	3,72	1,49-9,31	**0,005**
	GG	11	9				

En la Tabla 50 se muestra la interacción de este polimorfismo con el PCa analizando la interacción entre las variables de estudio.

Aunque en el análisis individual de las variantes, el tabaquismo no parecía ejercer un gran impacto en la influencia del marcador sobre la enfermedad, al valorar la influencia conjunta con la edad o el índice de masa corporal se desvelan resultados de alto impacto y estadísticamente significativos. Así, el efecto de riesgo del genotipo AA se ve más claramente en varones del rango etario 65-69 años o con obesidad cuando, además, son fumadores.

Donde más se pone de manifiesto el riesgo del genotipo AA es en los individuos con obesidad y consumidores de tabaco, con una susceptibilidad 5 veces mayor que en referencia al alelo G. En menor medida, los individuos de este rango etario y fumadores con el alelo A en homocigosis manifiestan un aumento en el riesgo de PCa casi cuatro veces superior que aquellos con el alelo G.

Células sometidas a estos factores estresantes podrían ser más propensas a desarrollar daños genómicos. Ante la ausencia de mecanismos de reparación eficaces, la apoptosis sería la principal defensa frente a la proliferación de estas células con un potencial tumoral.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el rs3740286 está localizado en el intrón 1 del gen *FAS*, el cual puede ser transcrito en dirección opuesta para dar lugar al RNA largo no codificante FAS-AS1. Se ha descrito que el FAS-AS1 podría aumentar la producción de formas solubles de FAS, ya que puede guiar al complejo de *splicing* SPF45 a la región del exón 6 del ARNm de *FAS*, codificador del dominio de membrana, favoreciendo su eliminación (Villamizar *et al*., 2016; Yan *et al*., 2005). De hecho, en carcinoma de próstata, se ha comprobado un aumento en la expresión de este factor de *splicing*, asociándose con una mayor tasa de proliferación, invasión celular o resistencia a la quimioterapia (Villamizar *et al*., 2016).

En este contexto, es posible que personas carentes del alelo G correspondiente al rs3740286 presenten una mayor susceptibilidad al cáncer de próstata porque dicho alelo se asocie con una mayor producción de formas solubles de FAS. Estas formas solubles de FAS actúan como competidoras de las formas de membrana por la unión al FASL expresado en células *natural killer* y linfocitos T citotóxicos. Personas sin esta variante alélica podrían, por lo tanto, presentar una resistencia a la apoptosis mediada por FAS, evadiendo la vigilancia inmunitaria y dirigiendo, finalmente a la formación tumoral.

No obstante, la implicación de este polimorfismo en la funcionalidad e integridad de la proteína FAS está por dilucidar y la relación del tránscrito FAS-AS1 con la producción de formas solubles de FAS está sujeta a controversia entre distintos investigadores (Sehgal *et al*., 2014).

Tabla 50. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD 65-69 &	AA	12	6	AA vs. GG	0,67	0,05-8,23	0,746
PY =0	AG	10	7	AA vs. AG	1,40	0,35-5,64	0,631
	GG	3	1				
EDAD 65-69 &	AA	17	5	AA vs. GG	3,97	0,92-17,12	0,061
PY >0	AG	18	18	AA vs. AG	3,40	1,05-11,00	**0,039**
	GG	6	7				
IMC ≥30 &	AA	5	3	AA vs. GG	0,33	0,02-4,56	0,393
PY =0	AG	8	5	AA vs. AG	1,04	0,16-6,70	0,965
	GG	8	1				
IMC ≥30 &	AA	19	5	AA vs. GG	5,07	1,23-20,88	**0,023**
PY >0	AG	21	31	AA vs. AG	5,61	1,90-16,53	**0,002**
	GG	6	8				

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5.3. rs10509561 (*FAS*).

Para este polimorfismo, el alelo menos frecuente es el A, con una distribución similar en ambos grupos muestrales (0,348 en casos y 0,350 en controles), lo cual está en concordancia con lo descrito en población europea (0,300-0,360) (*The 1000 Genomes Project Consortium*) (Tabla 51). Mediante el cálculo del estadístico t_s no se observan diferencias entre las frecuencias alélicas de casos y controles (p= 0,475). En cuanto a las frecuencias genotípicas en la muestra de controles, éstas no se diferencian de lo que cabría esperar en situación de equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 0,134; p= 0,700). La diversidad genética es elevada para el rs10509561 con un índice h de 0,456 en casos y de 0,457 en controles.

Tabla 51. Distribución genotípica y alélica del rs10509561 (*FAS*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
TT	110 (44,53)	82 (41,62)	T	0,652 ± 0,021	0,650 ± 0,024
AT	102 (41,30)	92 (46,70)	A	0,348 ± 0,021	0,350 ± 0,024
AA	35 (14,17)	23 (11,68)			
$\hat{h}$				0,456 ± 0,019	0,457 ± 0,021
Eq. H-W x^2 (p)	0,134 (0,700)				
Estadístico t_s (p)				0,062 (0,475)	

El impacto de este marcador en la muestra sin estratificar es bajo, ya que no se observan resultados estadísticamente significativos en ninguno de los modelos genéticos analizados (Tabla 52). El modelo más informativo es el codominante puesto que parece apreciarse un efecto diferente en la enfermedad para cada uno de los genotipos. De este modo, aunque los datos son apenas reseñables, sí podrían sugerir que los individuos con la variante genotípica AA son los que presentan la mayor predisposición al carcinoma de próstata.

Este es el primer estudio que valora la asociación del marcador rs10509561 con el inicio del cáncer, aportando, por lo tanto, información novedosa sobre la influencia de las distintas variantes genotípicas del mismo en la mayor o menor predisposición a desarrollar un proceso tumoral, más concretamente de etiología prostática.

Tabla 52. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*P*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
AA vs. TT	1,13	0,62-2,07	0,680	1,23	0,66-2,31	0,516
AA vs. AT	1,37	0,76-2,49	0,297	1,35	0,72-2,52	0,344
TT vs. AT	1,21	0,81-1,81	0,352	1,12	0,74-1,69	0,606
Dominante						
AA+AT vs. TT	0,89	0,61-1,30	0,539	0,97	0,65-1,44	0,871
Recesivo						
AA vs. TT+AT	1,25	0,71-2,19	0,438	1,29	0,72-2,31	0,401
Sobredominante						
AA+TT vs. AT	1,25	0,85-1,82	0,254	1,16	0,78-1,72	0,464
Alélico						
A vs. T	0,99	0,75-1,31	0,949	1,04	0,79-1,39	0,770

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 53 se muestran los intervalos de máximo impacto en el análisis de asociación de este marcador con el PCa estratificando la muestra mediante las tres variables de estudio.

La variable edad ejerce una gran influencia en la relación de este marcador con el inicio del cáncer de próstata. El efecto diferencial de los genotipos de este SNP se pone especialmente de manifiesto en los individuos con una edad comprendida entre los 65 y los 69 años, obteniendo resultados estadísticamente significativos. En el modelo alélico se observa un *Odds Ratio* de 2,09 (p= 0,014) para los sujetos que llevan en el genoma el alelo A con respecto de aquellos que llevan el alelo T. El efecto protector del alelo T parece ser dosis-dependiente, siendo mayor para los portadores de este alelo en homocigosis (TT) que en heterocigosis (AT). De este modo, los individuos con el genotipo AA manifiestan un riesgo hasta 6 veces superior de padecer cáncer de próstata que los portadores del genotipo TT (OR= 6,00; p= 0,017) y 3 veces superior con respecto de aquellos AT, aunque en la comparación con el heterocigoto no se obtiene suficiente evidencia estadística.

Con el envejecimiento se produce una pérdida progresiva de la capacidad de reparación celular así como un debilitamiento del sistema inmune originado por una mayor destrucción de linfocitos T (Pinti *et al*., 2002). Partiendo de la base de que el rs10509561 se localiza en el intrón 1 del gen *FAS*, es posible que el cambio de una variante alélica por otra pueda afectar al nivel de formas solubles de FAS. De este modo, personas carentes del alelo T podrían presentar una mayor tendencia a la secreción de estas formas solubles en el medio extracelular, antagonizando el sistema FAS-FASL.

Ante posibles mutaciones asociadas al envejecimiento celular, las células portadoras del genotipo AA podrían manifestar una menor capacidad apoptótica por un aumento de la resistencia a la apoptosis mediada por las formas solubles, lo que sumado a una defensa inmunitaria pobre podrían favorecer el establecimiento de un cáncer. En este sentido, se ha visto que personas con cáncer de próstata presentan niveles más elevados de formas solubles de FAS que aquellos con hiperplasia benigna, asociándose con un mal pronóstico (Furuya *et al*., 2001; Furuya *et al*., 2003).

Por otra parte, en nuestro estudio no se obtiene suficiente asociación estadística en personas con una edad muy avanzada (≥70), donde incluso el genotipo AA parece manifestar un cierto efecto protector. Estos datos aparentemente contradictorios podrían explicarse teniendo en cuenta que este polimorfismo se sitúa en una región intrónica donde existen elementos de respuesta al p53, pudiendo afectar a la expresión del gen *FAS* (Munsch *et al*., 2000). Ante un daño excesivo causado por el envejecimiento, el p53 podría favorecer la apoptosis a través de la vía FAS-FASL, pero el cambio de una variante por otra en el polimorfismo rs10509561 podría destruir el sitio de unión al p53, desembocando en una menor expresión génica de *FAS* y una resistencia a la apoptosis.

Por consiguiente, una misma variante podría asociarse con el aumento en la secreción de formas solubles de FAS pero también con un aumento en la expresión del gen *FAS* en respuesta al p53, lo que podría conducir a una susceptibilidad diferencial al cáncer en función del daño celular. En todo caso, esta hipótesis debe ser validada en un futuro.

El efecto diferencial de las variantes de este marcador en el cáncer de próstata también parece verse más claramente en los sujetos obesos, en tanto que la susceptibilidad asociada al genotipo AA es hasta 3 veces superior que la de portadores del alelo T (Tabla 3). En la figura 74 se observa, además, un incremento progresivo del riesgo que comporta el genotipo AA a medida que aumenta el grado de obesidad de los individuos. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que no se obtiene suficiente evidencia estadística, debido probablemente, al bajo tamaño muestral encontrado en personas portadoras del alelo A en homocigosis.

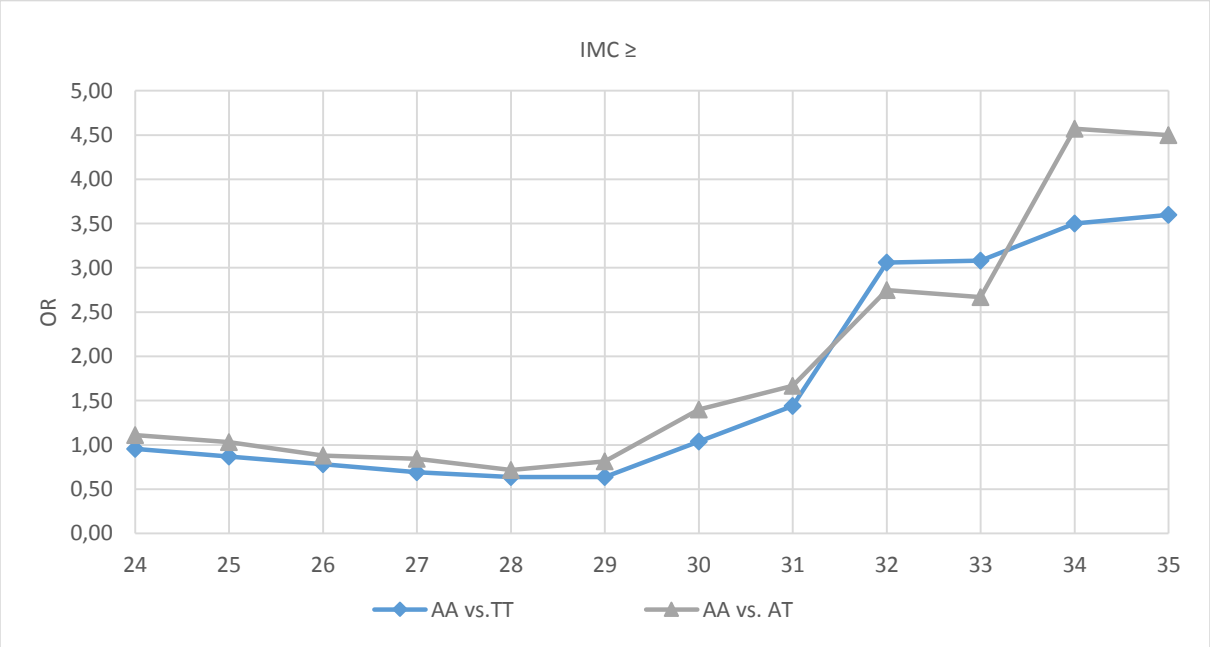

Figura 74. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (*FAS*-rs10509561).

Tabla 53. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	TT	55	28	AA vs. TT	1,24	0,46-3,34	0,674
<65	AT	40	27	AA vs. AT	1,64	0,60-4,49	0,333
	AA	17	7				
	TT	24	24	AA vs. TT	6,00	1,36-26,51	**0,017**
65-69	AT	31	18	AA vs. AT	3,48	0,74-16,41	0,112
	AA	13	2				
	TT	30	29	AA vs. TT	0,41	0,14-1,21	0,106
≥70	AT	29	45	AA vs. AT	0,67	0,23-1,93	0,451
	AA	6	14				
Tabaquismo (PY)							
	TT	28	23	AA vs. TT	1,23	0,43-3,55	0,152
No fumadores	AT	34	29	AA vs. AT	1,28	0,46-3,57	0,636
	AA	12	8				
	TT	78	58	AA vs. TT	1,14	0,55-2,38	0,726
Fumadores	AT	66	59	AA vs. AT	1,37	0,65-2,87	0,402
	AA	23	15				
	TT	60	42	AA vs. TT	1,05	0,46-2,42	0,908
>0-<46	AT	43	32	AA vs. AT	1,12	0,47-2,65	0,802
	AA	18	12				
	TT	18	16	AA vs. TT	1,48	0,30-7,30	0,625
≥46	AT	23	27	AA vs. AT	1,96	0,42-9,04	0,386
	AA	5	3				
IMC							
	TT	87	49	AA vs. TT	0,86	0,44-1,69	0,661
<32	AT	76	49	AA vs. AT	0,98	0,50-1,95	0,963
	AA	29	19				
	TT	17	13	AA vs. TT	3,06	0,32-29,16	0,324
≥32	AT	16	11	AA vs. AT	2,75	0,28-27,14	0,379
	AA	4	1				

La relación del rs10509561 con la enfermedad analizando la interacción entre las variables de estudio se muestra en la Tabla 54. Debido a la reducción muestral que se produce al seleccionar individuos con un consumo de tabaco muy elevado (≥46 py), el análisis de interacción se ha realizado seleccionando solo individuos fumadores. Aunque no se desvelan resultados estadísticamente significativos, el efecto de riesgo del genotipo AA en personas obesas se acentúa cuando éstas, además, son consumidoras de tabaco, aumentando la susceptibilidad hasta 4 veces en comparación con la predisposición asociada al alelo T.

Tabla 54. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD 65-69 &	TT	14	17	AA vs. TT	4,25	0,80-22,46	0,085
PY>0	AT	19	11	AA vs. AT	2,03	0,36-11,54	0,420
	AA	7	2				
IMC ≥32 &	TT	11	12	AA vs. TT	4,36	0,46-41,37	0,191
PY >0	AT	11	10	AA vs. AT	3,63	0,37-36,16	0,261
	AA	4	1				

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5.4. rs763110 (*FASLG*).

En la Tabla 55 se detallan las frecuencias alélicas y genotípicas para el rs763110 en ambos grupos muestrales. La variante alélica T es la menos frecuente en ambas subpoblaciones (0,389 en casos y 0,378 en controles), no encontrandose diferencias estadísticamente significativas entre ellas (t_s= 0,348; *p*= 0,728). La frecuencia del alelo T en nuestra población está dentro del rango de variación de la frecuencia descrita en otras poblaciones europeas (0,180-0,420) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Tras la obtención de las frecuencias genotípicas en la población control, no existen evidencias en contra de que la población se encuentre en equilibrio genético para este marcador (χ^2= 0,179; *p*= 0,675).

Tabla 55. Distribución genotípica y alélica del rs763110 (*FASLG*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
CC	93 (37,50)	73 (38,02)	C	0,611 ± 0,022	0,622 ± 0,025
CT	117 (47,18)	93 (48,44)	T	0,389 ± 0,022	0,378 ± 0,025
TT	38 (15,32)	26 (13,54)			
$\hat{h}$				0,477 ± 0,014	0,472 ± 0,017
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,179 (0,675)				
Estadístico t_s (*p*)				0,348 (0,728)	

Aunque no se obtienen resultados estadísticamente significativos en el análisis de asociación del polimorfismo con el PCa a nivel global (Tabla 56), sí se aprecian ciertas tendencias. Los modelos que más información aportan son el codominante y el recesivo. De este modo, los resultados apuntan claramente a un alelo T de riesgo cuando no existe alternativa alélica. En otras palabras, los individuos que llevan en el genoma el genotipo TT de este marcador parecen presentar un aumento en el riesgo en comparación con los portadores del alelo C, con una predisposición similar tanto en referencia a homocigotos como a heterocigotos.

Nuestro estudio es el primero en analizar la influencia de la variabilidad genética de este SNP en el desarrollo del PCa en población de ancestralidad Caucasoide. El conocimiento acerca de la relación de este marcador con la carcinogénesis de próstata deriva, hasta el momento, de un estudio llevado a cabo con población de etnia *Han Chinese*. Aunque los resultados de este estudio no alcanzan la significación estadística, sí que se observa una tendencia similar a lo descrito en nuestro trabajo, encontrado un aumento en el riesgo para los individuos con el genotipo TT (Shao *et al*., 2011).

Apoyando los resultados de este estudio, el genotipo TT también se ha vinculado con una mayor susceptibilidad a desarrollar carcinoma cervical (Wu *et al*., 2017), leucemia infantil (Tong *et al*., 2012), carcinoma hepatocelular (Khalifa *et al*., 2016), cáncer de esófago (Zhao *et al*., 2014) y diversos cánceres del sistema reproductor femenino, como el de mama, el cervical o el endometrial (Hashemi *et al*., 2013; Nallapalle *et al*., 2015).

Aun así, la bibliografía respecto de este marcador es extensa y no existe unanimidad entre autores, de tal modo que los individuos con el genotipo CC también se han asociado con un aumento en el riesgo de padecer una variedad de tipos tumorales.

Tabla 56. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR	IC 95%[a]	*p*
Codominante						
TT vs. CC	1,15	0,64-2,06	0,646	1,25	0,68-2,29	0,475
TT vs. CT	1,16	0,66-2,05	0,605	1,14	0,64-2,06	0,653
CT vs. CC	0,99	0,66-1,49	0,952	1,09	0,71-1,68	0,682
Dominante						
TT+CT vs. CC	1,02	0,69-1,51	0,911	1,13	0,75-1,69	0,562
Recesivo						
TT vs. CC+CT	1,16	0,67-1,98	0,599	1,19	0,68-2,08	0,540
Sobredominante						
CT vs. TT+CC	0,95	0,65-1,39	0,793	1,03	0,69-1,52	0,900
Alélico						
T vs. C	1,05	0,80-1,38	0,728	1,11	0,83-1,48	0,470

[a]Análisis ajustado por edad.

La relación del rs763110 con el cáncer de próstata estratificando la muestra en función de las distintas variables de estudio se muestra en la Tabla 57.

Al valorar la interacción con la edad no se obtiene suficiente evidencia estadística en ninguno de los intervalos analizados aunque el efecto de riesgo del genotipo TT parece verse más claramente en aquellos varones con una edad avanzada (≥73 años), donde la susceptibilidad para los individuos con este genotipo es hasta dos veces superior que la correspondiente a aquellos portadores del alelo C.

Sin embargo, es precisamente en el tabaquismo donde encontramos más claramente la relevancia del rs763110. En los individuos consumidores de una cantidad de tabaco por debajo de los 50 *pack-years* el efecto diferencial de los genotipos no se observa. Por el contrario, los hombres fumadores de una cantidad extrema de tabaco (≥50 *pack-years*) que presentan el genotipo TT manifiestan un riesgo 12 veces superior que los portadores del alelo C (CT y CC). He aquí, que llevar una variante genotípica u otra confiere un riesgo inequívocamente diferencial, alcanzando OR de muy alto impacto y valores de *p* claramente significativos. De este modo, se observa un *Odds Ratio* de 9,38 cuando se compara el efecto del genotipo TT con el CC, pero llega a alcanzar un valor de 15,00 cuando es comparado con el genotipo CT.

El FASL presenta una función depurativa en el organismo en tanto que permite la eliminación de células con daños genotóxicos ocasionados, por ejemplo, por los carcinogénos del tabaco. Su expresión en linfocitos T citotóxicos y células *natural killer* permite la unión al receptor FAS de la célula diana pre-tumorigénica, favoreciendo su eliminación por medio de apoptosis, lo cual evita el establecimiento de un cáncer. Sobre la base de que el alelo C del marcador rs763110 se ha vinculado con un aumento en la expresión del gen *FASLG* debido a la creación de un sitio de unión para el factor de transcripción C/EBPβ (Wu *et al*., 2003), las

personas que carecen de tal alelo estarían vinculadas con una menor capacidad de eliminación de células dañinas.

Por lo tanto, la función depurativa pro-apoptótica dependendería notablemente del genotipo molecular, presentando los individuos con el genotipo TT una baja eficacia en la capacidad de inhibir la tumorigénesis en los estadios iniciales debido a una menor capacidad apoptótica mediada por el sistema FAS-FASL. Esta posibilidad, sumada a que los individuos fumadores crónicos manifiestan un debilitamiento del sistema inmune por la autodestrucción de linfocitos (Suzuki *et al*., 1999), serían factores clave que podrían determinar un aumento en la incidencia del PCa en las personas fumadoras carentes del alelo C en su genoma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 57. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	CC	81	51	TT vs. CC	0,99	0,51-1,95	0,986
<73	CT	107	65	TT vs. CT	0,96	0,50-1,84	0,900
	TT	30	19	TT vs. CC+CT	0,97	0,52-1,81	0,934
	CC	10	22	TT vs. CC	2,20	0,61-7,98	0,225
≥73	CT	10	25	TT vs. CT	2,50	0,70-8,94	0,155
	TT	7	7	TT vs. CC+CT	2,35	0,74-7,49	0,146
Tabaquismo (PY)							
	CC	28	24	TT vs. CC	0,75	0,24-2,39	0,624
No fumadores	CT	39	27	TT vs. CT	0,61	0,20-1,87	0,381
	TT	7	8	TT vs. CC+CT	0,67	0,23-1,95	0,458
	CC	61	47	TT vs. CC	1,28	0,64-2,58	0,482
Fumadores	CT	77	63	TT vs. CT	1,36	0,70-2,67	0,365
	TT	30	18	TT vs. CC+CT	1,33	0,70-2,51	0,380
	CC	45	32	TT vs. CC	0,84	0,38-1,85	0,658
>0-<50	CT	61	39	TT vs. CT	0,75	0,35-1,61	0,463
	TT	20	17	TT vs. CC+CT	0,79	0,39-1,61	0,512
	CC	16	15	TT vs. CC	9,38	1,37-64,30	**0,021**
≥50	CT	16	24	TT vs. CT	15,00	2,50-90,03	**0,003**
	TT	10	1	TT vs. CC+CT	12,19	2,13-69,60	**0,005**
IMC							
	CC	29	19	TT vs. CC	0,82	0,27-2,47	0,721
<27	CT	40	20	TT vs. CT	0,63	0,21-1,83	0,389
	TT	10	8	TT vs. CC+CT	0,71	0,26-1,94	0,499
	CC	57	40	TT vs. CC	1,82	0,79-4,19	0,154
≥27	CT	68	40	TT vs. CT	1,53	0,67-3,50	0,312
	TT	26	10	TT vs. CC+CT	1,66	0,76-3,62	0,198

El análisis de asociación del rs763110 con el PCa combinando las variables de estratificación se muestra en la Tabla 58.

El aumento en la predisposición al cáncer que parecen sugerir los datos para los sujetos con una edad igual o superior a los 73 años que carecen del alelo C se confirma cuando se valora la interacción con el IMC. De este modo, en los individuos de edad avanzada que presentan al menos un sobrepeso de grado II (IMC ≥27), portar el genotipo TT implica un riesgo hasta 11 veces mayor (*p*= 0,003) que llevar la variante alélica C, tanto en homocigosis como en heterocigosis. Aunque existe una realidad biológica irrefutable según la cual los individuos con estas características manifiestan un aumento en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, la escasez de sujetos en estas categorías, especialmente cuando se trata de varones afectados de PCa, hace necesaria la confirmación de tales resultados en una muestra poblacional más elevada.

Tabla 58. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD ≥73 & IMC ≥27	CC	5	13	TT vs. CC	7,80	1,26-48,39	**0,024**
	CT	2	13	TT vs. CT	19,50	2,61-145,95	**0,003**
	TT	6	2	TT vs. CC+CT	11,14	2,18-56,93	**0,003**
PY >0 & IMC ≥27	CC	41	27	TT vs. CC	1,98	0,74-5,26	0,171
	CT	43	32	TT vs. CT	2,23	0,85-5,84	0,100
	TT	21	7	TT vs. CC+CT	2,11	0,85-5,22	0,106
PY ≥50 & IMC ≥27	CC	11	7	TT vs. CC	5,09	0,57-45,10	0,136
	CT	8	11	TT vs. CT	11,00	1,42-85,33	**0,019**
	TT	8	1	TT vs. CC+CT	7,58	1,07-53,63	**0,040**

5.5.5. rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*).

Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1800682, rs3740286 y rs10509561 en el gen *FAS* se muestran en la Figura 75. Se obtienen valores elevados del coeficiente de *Lewontin* entre los tres marcadores pero bajos coeficientes de correlación, lo que nos indica que no existe un desequilibrio de ligamiento completo entre ellos sino que existe cierto grado de recombinación genética. Los marcadores que presentan una segregación más independiente son el rs1800682 y el rs10509561 (D´= 0,679; r^2= 0,338). Por otra parte, el rs3740286 parece ser más dependiente del rs1800682 (D´= 0,999; r^2= 0,508) que del rs10509561 (D´= 0,976; r^2= 0,355).

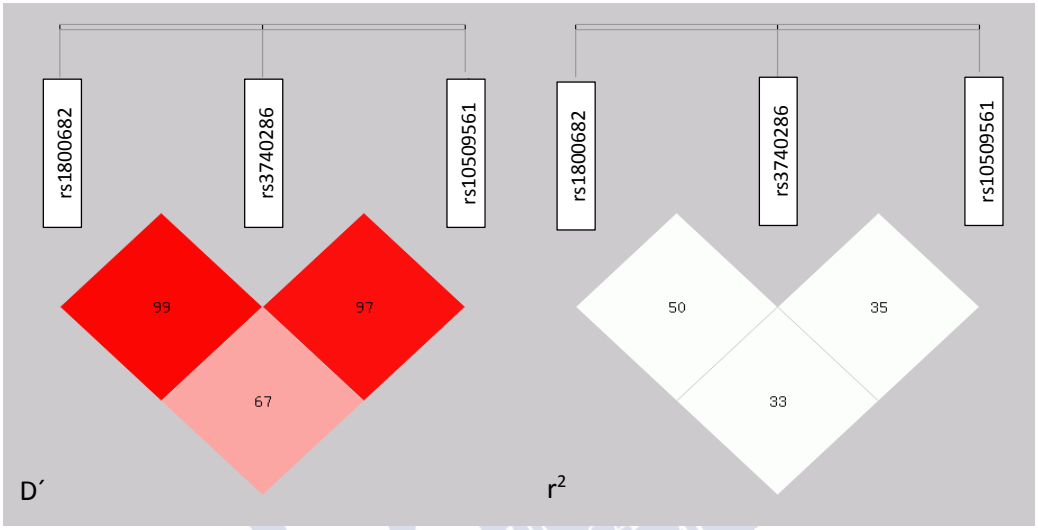

Figura 75. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1800682, rs3740286 y rs10509561 del *locus FAS*.

La distribución de frecuencias correspondientes a los haplotipos formados por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 y su asociación con el cáncer de próstata se muestra en la Tabla 59. De los 8 haplotipos posibles, en esta población se encuentran un total de 6. No obstante, la frecuencia del haplotipo A-G-A es extremadamente baja, de modo que queda excluido del análisis. No se detecta una asociación entre estos haplotipos y la susceptibilidad diferencial a padecer la enfermedad, con valores de OR similares a 1.

Tabla 59. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
A-A-A	0,039	0,061	A-A-A vs. -	0,62	0,34-1,14	0,126
A-A-T	0,117	0,107	A-A-T vs. -	1,11	0,73-1,68	0,640
A-G-A[b]	0,000	0,003	A-G-T vs. -	0,94	0,71-1,23	0,630
A-G-T	0,391	0,405	G-A-A vs. -	1,11	0,83-1,49	0,471
G-A-A	0,310	0,286	G-A-T vs. -	1,05	0,72-1,54	0,804
G-A-T	0,144	0,138				

[a]Orden de haplotipo: rs1800682A>G-rs3740286A>G-rs10509561T>A.
[b]Haplotipos con una frecuencia inferior a 0,030 quedan excluidos del análisis.

En la Tabla 60 se representa la distribución de frecuencias correspondientes a las combinaciones genotípicas determinadas por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 así como su influencia en el inicio del cáncer de próstata.

Se desvela un aumento significativo en el riesgo casi 4 veces superior para los individuos portadores de la combinación genotípica GG-AA-AA en comparación con aquellos que son AA-AG-AT (OR= 3,74; *p*= 0,037). Esta diferencia en la susceptibilidad al PCa en función de la presencia de una u otra combinación genotípica se acentúa en los varones con una edad comprendida entre los 65 y los 69 años (OR= 15,00; *p*= 0,008). Este resultado está en concordancia con lo obtenido en el análisis individual de cada polimorfismo, ya que los individuos con el genotipo rs1800682GG, el rs3740286AA o el rs10509561AA manifiestan una mayor predisposición al PCa con respecto de aquellos AA, AG o AT, respectivamente.

Por consiguiente, los resultados sugieren un efecto sinérgico entre los tres marcadores del gen *FAS* a la hora de iniciar el proceso carcinogénico. De este modo, una disminución de la expresión génica vinculada al rs1800682 conjuntamente con un aumento en la producción de formas solubles de FAS asociado al rs3740286 y al rs10509561 podrían favorecer la supervivencia celular debido a una gran resistencia a la apoptosis mediada por FAS, lo que finalmente predispondría a los sujetos con genotipos de riesgo a una mayor incidencia de cáncer de próstata.

Tabla 60. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*p*
AA-GG-TT	44 (17,89)	32 (16,24)	AA-GG-TT vs. -	1,11	0,67-1,83	0,687
AA-GG-AT[b]	0 (0)	1 (0,51)	AA-AG-TT vs. -	1,03	0,56-1,91	0,918
AA-AG-TT	26 (10,57)	20 (10,15)	AA-AG-AT vs. -	0,43	0,15-1,26	0,124
AA-AG-AT	5 (2,03)	9 (4,57)	AA-AA-AA vs. -	0,39	0,04-4,03	0,432
AA-AA-TT[b]	0 (0)	2 (1,02)	AG-AG-TT vs. -	1,05	0,56-1,96	0,887
AA-AA-AT[b]	1 (0,41)	0 (0)	AG-AG-AT vs. -	1,04	0,66-1,65	0,859
AA-AA-AA	1 (0,41)	2 (1,02)	AG-AA-TT vs. -	1,14	0,42-3,05	0,798
AG-AG-TT	25 (10,16)	19 (9,64)	AG-AA-AT vs. -	1,33	0,67-2,66	0,416
AG-AG-AT	49 (19,92)	47 (23,86)	AG-AA-AA vs. -	0,68	0,24-1,91	0,468
AG-AA-TT	10 (4,07)	7 (3,55)	GG-AA-TT vs. -	2,00	0,40-10,12	0,402
AG-AA-AT	23 (9,35)	14 (7,11)	GG-AA-AT vs. -	0,85	0,46-1,59	0,619
AG-AA-AA	7 (2,85)	8 (4,06)	GG-AA-AA vs. -	1,72	0,87-3,42	0,118
GG-AA-TT	5 (2,03)	2 (1,02)				
GG-AA-AT	23 (9,35)	21 (10,66)	GG-AA-AA vs. AA-AG-AT	3,74	1,07-13,08	**0,037**
GG-AA-AA	27 (10,98)	13 (6,60)	AA-AG-AT vs. GG-AA-AA	0,27	0,08-0,94	**0,037**

[a]Orden de combinación genotípica: rs1800682A>G-rs3740286A>G-rs10509561T>A.
[b]Combinaciones genotípicas excluidas del análisis.

5.5.6. rs1800682 (FAS)-rs3740286 (FAS)-rs10509561 (*FAS*)- rs763110 (*FASLG*).

Puesto que el receptor FAS trasmite la señal apoptótica al interior de la célula una vez que se une al ligando FASL, se ha valorado la influencia conjunta de los polimorfismos situados en estos genes sobre el desarrollo del cáncer de próstata (Tablas 61 y 62).

La interacción entre los SNPs rs3740286 y rs763110 desvela un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad para los individuos portadores de los genotipo AA y CC, respectivamente, en relación a los varones que llevan en el genoma cualquiera de las otras combinaciones genotípicas (OR= 1,80; *p*= 0,049). El efecto de riesgo de la combinación AA-CC se acentúa especialmente en referencia a la AG-CC (OR= 2,22; *p*= 0,026) o a la AG-CT (OR= 2,03; *p*= 0,043) (Tabla 61).

En el análisis individual de los polimorfismos se obtiene un aumento en el riesgo para los individuos con el genotipo AA en el rs3740286 en comparación con los heterocigotos AG, por lo que el análisis en conjunto con el SNP del *FASLG* solo potenciaría su efecto. Sin embargo,

con respecto al rs763110, los resultados obtenidos son aparentemente contradictorios, ya que en el análisis individual, el genotipo CC manifiesta un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad, mientras que en el análisis conjunto con el rs3740286 parece ejercer un efecto de riesgo.

Tabla 61. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs3740286 (*FAS*)-rs763110 (*FASLG*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
AA-CC	39	18	AA-CC vs. AG-CC	2,22	1,10-4,50	**0,026**
AA-CT	46	36	AA-CC vs. AG-CT	2,03	1,02-4,04	**0,043**
AA-TT	15	14	AA-CC vs. -	1,80	1,00-3,25	**0,049**
AG-CC	40	41				
AG-CT	48	45	AG-CC vs. AA-CC	0,45	0,22-0,91	**0,026**
AG-TT	18	8	AG-CT vs. AA-CC	0,49	0,25-0,98	**0,043**
GG-CC	14	14				
GG-CT	23	12				
GG-TT	5	4				

[a]Orden de combinación genotípica:rs3740286A>G-rs763110C>T

Sin embargo, los resultados del análisis conjunto de los polimorfismos rs10509561 y rs763110 son los que desvelan el máximo impacto en el inicio del cáncer de próstata (Tabla 62). Los individuos portadores de la combinación genotípica AA-CC manifiestan hasta 6 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que aquellos que son AA-TT (OR= 6,67; *p*= 0,036), y un incremento casi 3 veces superior en comparación con los sujetos que son AT-CT (OR= 2,91; *p*= 0,036).

Igual que ocurre en el caso anterior, se encuentra una concordancia con lo obtenido en el análisis individual para el polimorfismo rs10509561, con el genotipo AA ejerciendo un efecto de riesgo con respecto del heterocigoto AT, mientras que para el polimorfismo rs763110 los resultados son aparentemente antagónicos, ejerciendo el genotipo CC un efecto de riesgo.

Tabla 62. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs10509561 (*FAS*)-rs763110 (*FASLG*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
AA-CC	16	6	AA-CC vs. AA-TT	6,67	1,10-40,51	**0,036**
AA-TT	2	5	AA-CC vs. AT-CT	2,91	1,07-7,94	**0,036**
AT-CT	43	47				
			AA-TT vs. AA-CC	0,15	0,02-0,91	**0,036**
			AT-CT vs. AA-CC	0,34	0,13-0,93	**0,036**

[a]Orden de combinación genotípica:rs10509561T>A-rs763110C>T

En conclusión, los resultados de este estudio indican que los polimorfismos involucrados en la ruta de señalización FAS (rs1800682, rs3740286, rs10509561)-FASL (rs763110) manifiestan su máximo impacto al valorar la interacción gen-ambiente o gen-gen.

En línea con la ausencia de estudios respecto de la influencia individual de los polimorfismos rs3740286 y rs10509561 en la carcinogénesis, tampoco se ha valorado la influencia conjunta de estos marcadores con el rs1800682 o con el rs763110, por lo que los resultados aportados en este estudio son inéditos y deben ser contrastados con los resultados procedentes de estudios futuros.

5.6. *BIRC5*.

5.6.1. rs8073069 (*BIRC5*).

En la Tabla 63 se resume la distribución de genotipos y alelos correspondiente al rs8073069. No se observa una desviación de las frecuencias genotípicas en el grupo control de acuerdo con lo esperado en una situación de equilibrio genético (χ^2= 0,308; *p*= 0,575). La variante alélica C es la minoritaria en la muestra poblacional, con una distribución similar en casos (0,261) y en controles (0,234). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de ambos grupos muestrales (t_s= 1,039; *p*= 0,299). La frecuencia del alelo C en nuestra población se encuentra dentro del rango de variación de poblaciones europeas (0,250-0,320) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

Tabla 63. Distribución genotípica y alélica del rs8073069 (*BIRC5*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
GG	163 (56,40)	146 (59,35)	G	0,739 ± 0,018	0,766 ± 0,019
CG	101 (39,95)	85 (34,55)	C	0,261 ± 0,018	0,234 ± 0,019
CC	25 (8,68)	15 (6,10)			
$\hat{h}$				0,387 ± 0,025	0,360 ± 0,029
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,308 (0,575)				
Estadístico t_s (*p*)				1,039 (0,299)	

La asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata a nivel global se muestra en la Tabla 64. Los resultados obtenidos en los diferentes modelos genéticos son coherentes, apuntando a un mayor riesgo de cáncer para los individuos CC. El efecto del genotipo CC es similar con respecto de GG y CG, por lo que el modelo que mejor se ajusta es el recesivo (OR= 1,46). Por lo tanto, basta que el individuo sea portador de una copia del alelo G para presentar un efecto protector frente al PCa. No se obtiene evidencia estadística suficiente porque el tamaño muestral (n) es bajo en los individuos con el genotipo CC. Esto condiciona que el valor de *p* no alcance la significación estadística.

Es importante resaltar que el presente estudio es el primero en analizar la asociación de este polimorfismo con el desarrollo del cáncer de próstata. Como apoyo a nuestros resultados, en carcinoma de esófago (Yang *et al*., 2009) también se ha desvelado un efecto de riesgo para el alelo C, especialmente cuando no existe alternativa alélica. Dada la posición de este SNP en la región promotora o 5´UTR del gen *BIRC5* (-625G>C), el cambio de una variante alélica por otra podría afectar a la expresión de la proteína survivina. De hecho, se ha descrito una mayor frecuencia del alelo C en tejidos cancerígenos que presentan expresión de la survivina, mientras que en aquellos con expresión negativa existe una mayor frecuencia del genotipo GG (Yang *et al*., 2009). Teniendo en cuenta que la survivina presenta una función anti-apoptótica en la célula, personas con una mayor expresión de esta proteína, como podría ser el caso de aquellas con el alelo C, especialmente en homocigosis, podrían estar condicionadas a un aumento en el riesgo de cáncer.

Tabla 64. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
CC vs. GG	1,49	0,76-2,93	0,244	1,53	0,76-3,09	0,230
CC vs. CG	1,40	0,70-2,83	0,344	1,47	0,71-3,03	0,299
CG vs. GG	1,06	0,74-1,53	0,738	1,04	0,72-1,51	0,819
Dominante						
CC+CG vs. GG	1,13	0,80-1,59	0,491	1,11	0,78-1,58	0,550
Recesivo						
CC vs. CG+GG	1,46	0,75-2,83	0,263	1,51	0,76-2,99	0,241
Sobredominante						
CG vs. CC+GG	1,02	0,71-1,45	0,924	1,00	0,69-1,43	0,982
Alélico						
C vs. G	1,16	0,88-1,53	0,299	1,14	0,87-1,51	0,340

[a]Análisis ajustado por edad.

La asociación del rs8073069 con el PCa en función de las distintas variables de estudio se muestra en la Tabla 65. No se obtiene una asociación estadísticamente significativa en los intervalos de estratificación por edad, tabaquismo o IMC. No obstante, los sujetos con una edad inferior a los 64 años y portadores del alelo C en homocigosis parecen presentar un incremento en el riesgo de PCa con respecto de aquellos portadores del alelo G (OR= 2,71).

En relación al tabaquismo, el efecto diferencial de los genotipos parece ponerse más de manifiesto en los sujetos consumidores de una cantidad muy elevada de tabaco (≥48 py). Los carcinógenos del tabaco parecen ejercer una interrelación con la variabilidad genotípica a la hora de condicionar a los individuos a una mayor o menor susceptibilidad a la enfermedad. Así, en los individuos con un consumo extremo de tabaco llevar el genotipo CC implicaría un riesgo hasta 6 veces superior de padecer PCa que siendo portador del alelo G (OR= 6,26).

Con respecto al IMC, se obtienen tendencias más claras en los individuos con sobrepeso de grado II en adelante (≥27). Los varones con este valor de índice de masa corporal y portadores del genotipo CC parecen presentar una susceptibilidad mayor que la de aquellos de peso similar pero que llevan la variante alélica G (OR= 1,89), especialmente en homocigosis (OR= 2,05).

Tabla 65. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	GG	65	58	CC vs. GG	2,68	0,84-8,50	0,094
<64	CG	39	36	CC vs. CG	2,77	0,84-9,13	0,092
	CC	12	4	CC vs. CG+GG	2,71	0,88-8,39	0,083
	GG	93	86	CC vs. GG	1,11	0,46-2,70	0,818
≥64	CG	60	49	CC vs. CG	0,98	0,39-2,47	0,966
	CC	12	10	CC vs. CG+GG	1,06	0,44-2,53	0,898
Tabaquismo (PY)							
	GG	48	41	CC vs. GG	1,71	0,40-7,22	0,464
No fumadores	CG	33	30	CC vs. CG	1,82	0,42-7,88	0,421
	CC	6	3	CC vs. CG+GG	1,75	0,43-7,19	0,434
	GG	111	103	CC vs. GG	1,52	0,69-3,36	0,302
Fumadores	CG	65	53	CC vs. CG	1,33	0,58-3,07	0,497
	CC	18	11	CC vs. CG+GG	1,45	0,67-3,16	0,348
	GG	83	73	CC vs. GG	1,06	0,43-2,59	0,906
>0-<48	CG	46	34	CC vs. CG	0,89	0,34-2,30	0,804
	CC	12	10	CC vs. CG+GG	1,00	0,41-2,40	0,992
	GG	28	30	CC vs. GG	6,43	0,90-45,73	0,061
≥48	CG	19	19	CC vs. CG	6,00	0,79-45,79	0,081
	CC	6	1	CC vs. CG+GG	6,26	0,91-42,77	0,060
IMC							
	GG	51	44	CC vs. GG	1,01	0,31-3,24	0,991
<27	CG	28	21	CC vs. CG	0,88	0,25-3,02	0,831
	CC	7	6	CC vs. CG+GG	0,96	0,31-3,01	0,944
	GG	89	73	CC vs. GG	2,05	0,77-5,48	0,151
≥27	CG	63	42	CC vs. CG	1,67	0,60-4,63	0,325
	CC	15	6	CC vs. CG+GG	1,89	0,72-4,97	0,195

No se obtiene asociación estadísticamente significativa en el análisis de asociación del SNP con el PCa en función de la interacción entre las distintas variables de estudio (Tabla 66). Aun así, se encuentran *Odds Ratios* elevados en los individuos jóvenes (<64 años) y con un IMC igual o superior al sobrepeso de grado II. Los varones con estas características que lleven en el genoma el genotipo CC correspondiente al rs8073069 podrían tener hasta 5 veces más predisposición a desarrollar cáncer de próstata que aquellos portadores del alelo G.

Se obtienen resultados cercanos a la significación en personas con un IMC mayor o igual a 27 y con un consumo tabáquico moderado-alto (≥30 py). Los sujetos sometidos a estas condiciones del entorno celular y portadores del genotipo CC presentan 4 veces más riesgo de desarrollar PCa que los GG (p= 0,050). Este efecto se acentúa en los varones con un peso similar, pero fumadores de una cantidad muy elevada de tabaco (≥48 py), en los cuales carecer del alelo protector G (CC vs. CG+GG) podría suponer un incremento en el riesgo a la enfermedad 6 veces superior que siendo portadores de esta variante (OR= 6,10).

Tabla 66. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD <64 & IMC ≥27	GG	35	33	CC vs. GG	5,66	0,79-40,69	0,083
	CG	23	18	CC vs. CG	4,70	0,59-37,16	0,139
	CC	6	1	CC vs. CG+GG	5,28	0,75-37,20	0,094
EDAD <64 & PY ≥30	GG	22	15	CC vs. GG	3,41	0,39-29,78	0,262
	CG	17	12	CC vs. CG	3,53	0,39-31,83	0,254
	CC	5	1	CC vs. CG+GG	3,46	0,42-28,31	0,244
IMC ≥27 & PY ≥30	GG	30	27	CC vs. GG	4,50	0,99-20,50	0,050
	CG	30	19	CC vs. CG	3,17	0,65-15,32	0,149
	CC	10	2	CC vs. CG+GG	3,83	0,87-16,85	0,074
IMC ≥27 & PY ≥48	GG	17	14	CC vs. GG	5,83	0,76-44,93	0,086
	CG	12	11	CC vs. CG	6,46	0,81-51,53	0,074
	CC	6	0	CC vs. CG+GG	6,10	0,86-43,04	0,068

Si bien en todos los intervalos de estratificación se obtienen valores de OR muy elevados, no se alcanza la significación estadística en ninguno de ellos debido al bajo tamaño muestral inherente a la dicotomización y a que el genotipo CC, el que manifiesta un efecto de riesgo en todos los análisis efectuados, presenta frecuencias bajas en la población. No obstante, todos los resultados apuntan hacia la misma dirección en tanto que sistemáticamente se obtienen frecuencias mucho más elevadas del genotipo CC en la muestra de casos que de controles. Existe, por lo tanto, una realidad biológica irrefutable según la cual los individuos portadores de dos copias del alelo C manifiestan un aumento en la suceptibilidad al cáncer de próstata. En

otras palabras, sujetos portadores de una o dos copias del alelo G manifiestan un efecto protector frente al inicio del cáncer de próstata.

La ausencia de evidencia estadística en nuestro trabajo hace necesario que estos resultados sean contrastados con futuros estudios para esclarecer la relación entre los genotipos de este polimorfismo y el cáncer de próstata en poblaciones con diverso transfondo genético.

5.6.2. rs9904341 (*BIRC5*).

La variante alélica menos frecuente para este polimorfismo es la C, tanto en casos (0,370) como en controles (0,359), lo cual es coherente con lo descrito en otras poblaciones europeas, con un rango de variación entre 0,280 y 0,400 (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Las diferencias entre las frecuencias alélicas de ambos grupos muestrales no han resultado estadísticamente significativas tras aplicar el estadístico t_s (p= 0,734). En la muestra de controles las frecuencias genotípicas no se diferencian de las esperadas asumiendo equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 0,243; p= 0,625). La diversidad genética de este marcador es alta, con un índice h de 0,468 en casos y de 0,462 en controles.

Tabla 67. Distribución genotípica y alélica del rs9904341 (*BIRC5*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
GG	107 (44,21)	77 (40,31)	G	0,630 ± 0,022	0,641 ±0,025
CG	91 (37,60)	91 (47,64)	C	0,370 ± 0,022	0,359 ± 0,025
CC	44 (18,18)	23 (12,04)			
$\hat{h}$				0,468 ± 0,016	0,462 ± 0,020
Eq. H-W x^2 (p)	0,243 (0,625)				
Estadístico t_s (p)				0,340 (0,734)	

En la Tabla 68 se muestra el análisis de asociación del rs9904341 con el cáncer de próstata. El modelo que más información nos aporta acerca del comportamiento del marcador es el codominante. De este modo, se desvela un aumento en la susceptibilidad al cáncer de próstata para los individuos portadores del genotipo CC. Aunque solo resulta significativa la comparación con el genotipo heterocigoto CG (OR= 1,92; p= 0,037), el efecto de riesgo del genotipo CC también se manifiesta con respecto del GG (OR= 1,39) o del alelo G en general. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el estudio apuntan a un alelo C de riesgo cuando no existe alternativa, es decir, cuando los individuos son portadores de este alelo en homocigosis. Aunque en el modelo sobredominante también se obtienen resultados significativos, el efecto de riesgo del genotipo CC siempre es superior al del GG.

En consonancia con nuestros resultados, el genotipo CC se ha asociado sistemáticamente con un aumento en la susceptibilidad al cáncer, no solo prostático (Chen *et al*., 2013; Karimian *et al*., 2018), sino también colorrectal (Gazouli *et al*., 2009; Li *et al*., 2013), pulmonar (Guo *et al*., 2015; Javid *et al*., 2015), de vejiga (Jaiswal *et al*., 2012; Kawata *et al*., 2011), nasofaríngeo

(Ma *et al*., 2011), renal (Marques *et al*., 2013; Qin *et al*., 2012), pancreático (Qin & Yu, 2015), de esófago (Upadhyay *et al*., 2011) o de ovario (Velapasamy *et al*., 2013).

Dada la posición de este SNP en los elementos CDE/CHR del promotor génico (-31G>C), los cuales promueven la expresión de la survivina dependiente del ciclo celular, los individuos portadores del genotipo CC podrían asociarse con una menor afinidad del gen por las proteínas represoras de estos elementos. Esto conduciría a una mayor expresión de la survivina, lo cual resultaría en una disminución de la apoptosis celular y, por lo tanto, un incremento en la probabilidad de cáncer. Apoyando esta hipótesis, la variante C se ha asociado con una actividad transcripcional más elevada que la ancestral G (Jang *et al*., 2008) y ha sido encontrada más frecuentemente en líneas celulares carcinogénicas que normales (Xu *et al*., 2004). Se ha descrito, además, un aumento en los niveles de ARNm y proteína survivina para los individuos portadores del genotipo homocigoto CC en varios tipos de cáncer (Gazouli *et al*., 2009; Javid *et al*., 2015; Kawata *et al*., 2011; Li *et al*., 2013).

No obstante, el alelo C no solo se ha asociado con el incremento de la actividad transcripcional de la proteína survivina, con funciones anti-apoptóticas (Jang *et al*., 2008), sino también con isoformas pro-apoptóticas de la survivina, con posibles beneficios antitumorales (Antonacopoulou *et al*., 2010). La producción de isoformas anti y pro-apotóticas podría explicar la diferente funcionalidad del alelo C que se observa en nuestro estudio cuando se encuentra en homocigosis (riesgo) o en heterocigosis (protección).

Se ha visto, además, que este SNP se encuentra ubicado en una isla CpG (Karimian *et al*., 2018), de modo que el cambio de una variante por otra podría influir en el estado de metilación del promotor génico. El patrón de metilación del gen *BIRC5* podría afectar a la expresión de la survivina, asociándose las distintas variantes genéticas del rs9904341 con un riesgo diferencial al cáncer.

Tabla 68. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
CC vs. GG	1,38	0,77-2,47	0,282	1,37	0,75-2,50	0,313
CC vs. CG	1,91	1,07-3,41	**0,028**	1,92	1,04-3,55	**0,037**
GG vs. CG	1,39	0,92-2,10	0,118	1,41	0,92-2,16	0,115
Dominante						
CC+CG vs. GG	0,85	0,58-1,25	0,415	0,84	0,56-1,25	0,381
Recesivo						
CC vs. CG+GG	1,62	0,94-2,79	0,079	1,62	0,92-2,86	0,097
Sobredominante						
CC+GG vs. CG	1,51	1,03-2,22	**0,036**	1,53	1,02-2,27	**0,038**
Alélico						
C vs. G	1,05	0,79-1,39	0,734	1,03	0,78-1,37	0,820

[a]Análisis ajustado por edad.

En la Tabla 69 se muestran los intervalos de mayor impacto en el análisis de asociación entre el rs9904341 y el carcinoma prostático estratificando por distintas variables.

En el análisis de la variable edad se obtienen valores estadísticamente significativos en aquellos varones con una edad igual o superior a 73 años, apareciendo un riesgo máximo en los portadores del genotipo CC en comparación con los heterocigotos CG. Concretamente, los individuos con el alelo C en homocigosis manifiestan casi 6 veces más riesgo de cáncer que aquellos con el genotipo CG (OR=5,83; *p*= 0,020).

Del mismo modo, en aquellos individuos del mismo rango de edad pero portadores del genotipo GG también se observa un incremento del riesgo en referencia a heterocigotos CG (OR= 3,25; *p*= 0,030). No obstante, el efecto del genotipo CC es superior al del genotipo GG, por lo que los individuos portadores de este genotipo serían los que tendrían un mayor riesgo frente al desarrollo de este cáncer.

En la Figura 76 se observa la evolución del riesgo a desarrollar PCa a medida que avanza la edad de los individuos. El riesgo que comporta ser portador del genotipo CC no parece verse influenciado por la edad en menores de 65 años. No obstante, a partir de los 65 años se aprecia un progresivo aumento en la susceptibilidad de los individuos portadores de este genotipo a medida que se produce el envejecimiento.

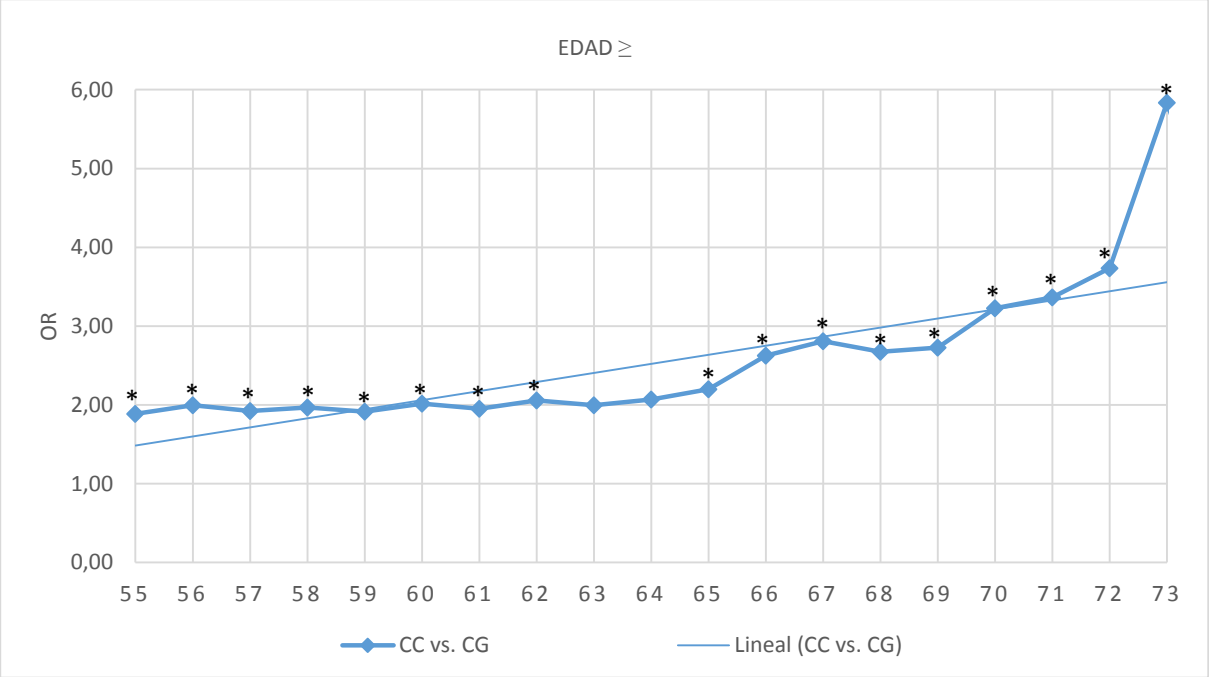

Figura 76. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*BIRC5*-rs9904341).
*Valores estadísticamente significativos usando un test x^2 ($p<0,05$).

Se ha visto que durante el envejecimiento se produce un incremento en los niveles de survivina, principalmente por un aumento en la estabilidad y vida media de la proteína gracias a su interacción con la chaperona Hsp90 (Al-Khalaf & Aboussekhra, 2013). De este modo, el incremento en el riesgo de PCa asociado a los individuos portadores del genotipo CC en rangos de edad elevados podría estar relacionado con un aumento en la expresión de la survivina asociada con su dotación genotípica y a una mayor estabilidad de la misma debido al envejecimiento. Ante un posible daño genotóxico causado por la liberación de especies reactivas de oxígeno, individuos con este genotipo podrían tener una menor capacidad apoptótica, desembocando en la proliferación tumoral.

Por otra parte, aquellos varones con el genotipo CC también manifiestan un incremento significativo (p= 0,028) en el riesgo de PCa cuando son fumadores, con un *Odds Ratio* de 2,20 en la comparación CC vs. CG. La susceptibilidad asociada a los individuos portadores del alelo C en homocigosis se ve más claramente cuando son consumidores de una cantidad de tabaco muy elevada (≥42 *pack-years*), observándose un incremento en el riesgo de PCa 3 veces superior en comparación con aquellos que llevan en el genoma el genotipo heterocigoto de este polimorfismo (OR= 3,24; p= 0,048).

Apoyando nuestros resultados, en carcinoma de pulmón se ha encontrado un aumento en la expresión de la survivina en individuos fumadores, con respecto de no fumadores, especialmente en aquellos con un consumo alto (>40 py) (Javid *et al*., 2015). Ciertos componentes del tabaco, como la nicotina o el NNK (nitrosamina cetona), son capaces de inducir la expresión *de novo* de la survivina en células epiteliales bronquiales normales (NHBE) por medio de la vía pro-supervivencia Akt-mTOR, jugando un papel fundamental en la transformación maligna de estas células (Jin, Menter, Mao, Hong & Lee, 2008).

Otro estudio en carcinoma de próstata (Karimian *et al*., 2018) desvela que el efecto de riesgo del alelo C es más acentuado en personas consumidoras de tabaco (OR= 1,94), por lo que en tejido prostático los carcinógenos del tabaco podrían ejercer el mismo efecto que en carcinoma de pulmón. De este modo, los individuos portadores del genotipo CC y fumadores podrían estar asociados con un aumento en la expresión de la survivina, incrementando el riesgo de desarrollo tumoral al presentar una menor tasa de apoptosis en respuesta a un daño genotóxico causado por el tabaquismo.

Por otra parte, en la valoración de la interrelación de la variabilidad genética del rs9904341 con el índice de masa corporal se revelan resultados estadísticamente significativos (p= 0,039) en los varones con sobrepeso o inicio de obesidad (25-30,99). Bajo estas condiciones de estrés del entorno celular, portar dos copias del alelo C duplica el riesgo a padecer la enfermedad en comparación con llevar el genotipo heterocigoto (OR= 2,47). Por lo tanto, el índice de masa corporal que presenten los individuos también es, en este caso, un factor que determina una manifestación más clara de la diferente eficacia funcional de las variantes genotípicas de este marcador.

Una posible explicación para estos resultados deriva del vínculo entre la survivina y la adiponectina. La adiponectina es una hormona secretada por los adipocitos encargada de regular el metabolismo energético del organismo, estimulando la oxidación de los ácidos grasos, reduciendo los triglicéridos plasmáticos y mejorando el metabolismo de la glucosa (Palomer, Pérez & Blanco-Vaca, 2005). Se ha visto que la adiponectina inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis e impide la angiogénesis, por lo que tendría un efecto protector frente al desarrollo del cáncer (Dalamaga, Diakopoulos & Mantzoros, 2012). La adiponectina puede

disminuir la expresión de la survivina inhibiendo la fosforilación y activación del factor pro-supervivencia Akt, el cual a su vez es necesario para estimular la expresión de la survivina en varias líneas celulares tumorales (Aminimoghaddam *et al*., 2015).

Puesto que los individuos con un IMC elevado se asocian con niveles más bajos de adiponectina (Kelesidis, Kelesidis & Mantzoros, 2006), es posible que el riesgo que comporta el genotipo CC se acentúe en los individuos con presencia de sobrepeso e inicio de obesidad por estar asociados con un aumento en la expresión de la survivina y un descenso de la hormona reguladora adiponectina. Apoyando estos resultados, se ha visto una relación epistásica entre el polimorfismo rs9904341 de la survivina y el polimorfismo rs1063539 de la adiponectina (Aminimoghaddam *et al*., 2015), de modo que los individuos portadores del alelo C en el rs9904341 y del genotipo GG en el rs1063539 presentaron un incremento en el riesgo a desarrollar carcinoma endometrial (OR= 4,77).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 69. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	GG	90	52	CC vs. GG	1,22	0,63-2,35	0,553
<73	CG	84	63	CC vs. CG	1,58	0,83-3,03	0,164
	CC	38	18	GG vs. CG	1,30	0,81-2,08	0,279
	GG	16	23	CC vs. GG	1,80	0,42-7,78	0,428
≥73	CG	6	28	CC vs. CG	5,83	1,29-26,38	**0,020**
	CC	5	4	GG vs. CG	3,25	1,11-9,47	**0,030**
Tabaquismo (PY)							
	GG	30	38	CC vs. GG	2,35	0,84-6,57	0,101
No fumadores	CG	28	24	CC vs. CG	1,59	0,55-4,65	0,392
	CC	13	7	GG vs. CG	0,68	0,33-1,40	0,291
	GG	75	48	CC vs. GG	1,28	0,62-2,63	0,500
Fumadores	CG	60	66	CC vs. CG	2,20	1,09-4,46	**0,028**
	CC	30	15	GG vs. CG	1,72	1,04-2,84	**0,034**
	GG	83	53	CC vs. GG	1,16	0,59-2,31	0,663
<42	CG	68	63	CC vs. CG	1,69	0,85-3,34	0,131
	CC	31	17	GG vs. CG	1,45	0,89-2,36	0,133
	GG	22	21	CC vs. GG	2,29	0,69-7,59	0,171
≥42	CG	20	27	CC vs. CG	3,24	1,00-10,46	**0,048**
	CC	12	5	GG vs. CG	1,41	0,61-3,26	0,413
IMC							
	GG	16	7	CC vs. GG	2,63	0,27-25,51	0,398
<25	CG	16	12	CC vs. CG	4,50	0,53-38,15	0,162
	CC	6	1	GG vs. CG	1,71	0,53-5,52	0,361
	GG	71	32	CC vs. GG	1,40	0,59-3,31	0,439
25-30,99	CG	44	35	CC vs. CG	2,47	1,04-5,87	**0,039**
	CC	28	9	GG vs. CG	1,76	0,96-3,24	0,069
	GG	13	18	CC vs. GG	1,73	0,38-7,80	0,470
≥31	CG	25	18	CC vs. CG	0,90	0,21-3,88	0,887
	CC	5	4	GG vs. CG	0,52	0,20-1,33	0,169

En la Tabla 70 se muestra la asociación del polimorfismo con el carcinoma prostático teniendo en cuenta la interacción entre las variables de estudio. Aunque en la estratificación individual de variables ya se observa una predisposición al cáncer diferente en función de las distintas variantes genotípicas del rs9904341, es al valorar la influencia conjunta de los tres factores de estudio (edad, tabaquismo e índice de masa corporal) donde tal efecto se manifiesta de forma más clara, con resultados estadísticamente significativos y de alto impacto.

La edad puede considerarse como la variable que más influencia presenta en este marcador, en tanto que los máximos valores de OR se observan en los individuos con una edad avanzada (≥ 73 años) cuando son fumadores con un elevado consumo tabáquico (≥42 py) o presentan sobrepeso o inicio de obesidad (IMC= 25-30,99). Los varones portadores del genotipo CC que presentan una edad avanzada y, además, son fumadores de esta cantidad de tabaco, manifiestan una susceptibilidad al PCa casi 14 veces superior que la de aquellos que son CG (OR= 13,50; *p*= 0,039). En el caso de los individuos sometidos a un estrés derivado del envejecimiento y que además presentan sobrepeso o inicio de obesidad, el riesgo de los portadores del genotipo CC se dispara hasta ser 18 veces mayor que el de aquellos con el genotipo CG (OR= 18,00; *p*= 0,017).

El aumento en la susceptibilidad para los varones portadores del alelo C en homocigosis también se acentúa si tienen sobrepeso y además son consumidores de un elevado número de *pack-years* (OR= 12,38; *p*= 0,013).

Tabla 70. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
EDAD ≥73 & PY >0	GG	11	17	CC vs. GG	1,93	0,42-8,89	0,391
	CG	2	19	CC vs. CG	11,88	1,95-72,25	**0,006**
	CC	5	4	GG vs. CG	6,15	1,32-28,67	**0,020**
EDAD ≥73 & PY ≥42	GG	3	9	CC vs. GG	4,50	0,49-40,96	0,169
	CG	1	9	CC vs. CG	13,50	1,05-174,27	**0,039**
	CC	3	2	GG vs. CG	3,00	0,27-33,96	0,364
EDAD ≥73 & IMC 25-30,99	GG	10	11	CC vs. GG	3,30	0,31-35,56	0,315
	CG	2	12	CC vs. CG	18,00	1,57-206,13	**0,017**
	CC	3	1	GG vs. CG	5,45	1,04-28,62	**0,042**
IMC 25-30,99 & PY >0	GG	50	22	CC vs. GG	1,76	0,59-5,28	0,310
	CG	27	26	CC vs. CG	3,85	1,30-11,42	**0,014**
	CC	20	5	GG vs. CG	2,19	1,05-4,56	**0,036**
IMC 25-30,99 & PY ≥42	GG	14	9	CC vs. GG	5,79	0,72-46,68	0,094
	CG	8	11	CC vs. CG	12,38	1,65-92,91	**0,013**
	CC	9	1	GG vs. CG	2,14	0,62-7,42	0,226

5.6.3. rs8073069 - rs9904341 (*BIRC5*).

Puesto que los polimorfismos rs8073069 y rs9904341 se encuentran situados en la región promotora del gen *BIRC5*, se han realizado análisis de desequilibrio de ligamiento para valorar la posibilidad de que éstos no segreguen de forma independiente. Se ha obtenido un valor elevado del coeficiente de Lewontin (D´= 0,999) entre ambos marcadores, pero un bajo coeficiente de correlación (r^2= 0,176) (Figura 77). Estos resultados nos indican que los polimorfismos no presentan un desequilibrio de ligamiento completo y existe cierto grado de recombinación genética entre ellos, permitiendo la existencia de más de dos haplotipos.

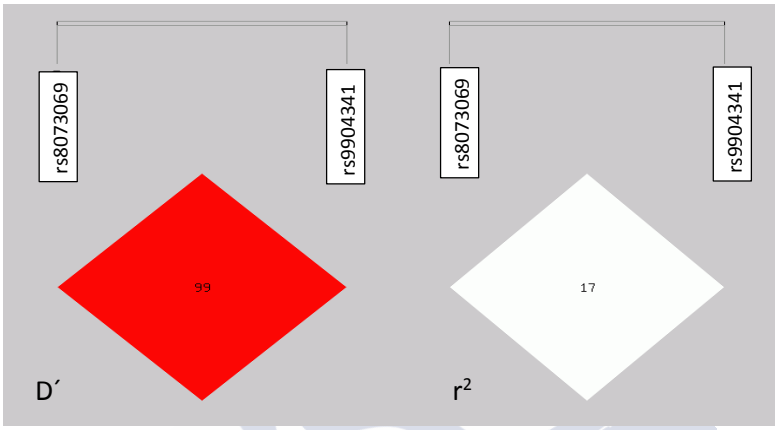

Figura 77. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs8073069 y rs9904341 del *locus BIRC5*.

En la Tabla 71 se muestra la distribución de frecuencias correspondientes a los haplotipos formados por los polimorfismos rs8073069-rs9904341, así como su asociación con la carcinogénesis prostática. De los cuatro haplotipos posibles, solo se han encontrado tres: G-G, G-C y C-G.

Cuando se compara la influencia en el cáncer de próstata de un haplotipo con respecto del resto, se obtiene una tendencia de riesgo para los individuos portadores del C-G (OR= 1,13) y un ligero efecto protector para aquellos G-G (OR= 0,88). Aunque no se desvela ninguna relación estadísticamente significativa en nuestro estudio, el efecto protector del haplotipo rs8073069G-rs9904341G (G-G-A-C) se confirma en carcinoma pulmonar cuando estos dos polimorfismos se combinan con los rs2071214-rs1042489 (Guo *et al*., 2015; Jang *et al*., 2008). Por lo tanto, el estudio de regiones más amplias del genoma podría ayudar a dilucidar la relación de la variabilidad genética en el *locus BIRC5* con la susceptibilidad diferencial al cáncer de próstata.

Tabla 71. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs8073069-rs9904341 (*BIRC5*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
G-G	0,371	0,402	G-G vs. C-G	0,84	0,60-1,19	0,338
			G-G vs. G-C	0,91	0,66-1,24	0,532
G-C	0,369	0,362	G-G vs. -	0,88	0,67-1,16	0,366
C-G	0,259	0,237				
			G-C vs. C-G	0,93	0,66-1,33	0,694
C-C[b]	0,000	0,000	G-C vs. G-G	1,10	0,81-1,51	0,532
			G-C vs. -	1,04	0,78-1,37	0,819
			C-G vs. G-C	1,07	0,75-1,53	0,694
			C-G vs. G-G	1,19	0,84-1,68	0,338
			C-G vs. -	1,13	0,83-1,54	0,447

[a]Orden de haplotipo: rs8073069G>C-rs9904341G>C.
[b]Haplotipos con una frecuencia inferior a 0,030 quedan excluidos del análisis.

En la Tabla 72 se muestran las frecuencias de las combinaciones genotípicas de los marcadores rs8073069-rs9904341 así como su posible asociación con el desarrollo de PCa.

Los resultados derivados de este análisis desvelan que los individuos portadores del genotipo GG en el rs8073069 y del CG en el rs9904341 presentan un descenso significativo en el riesgo de desarrollar PCa con respecto de aquellos portadores de cualquiera de las otras combinaciones (OR= 0,63; *p*= 0,035). El efecto protector para los individuos con esta combinación genotípica se pone especialmente de manifiesto cuando se compara con aquellos con la combinación GG-CC (OR= 0,48; *p*= 0,020).

Tanto el genotipo GG (rs8073069) como el CG (rs9904341) muestran un efecto protector en el análisis de cada marcador individualmente, aunque los resultados solo fueron significativos en el caso del rs9904341, por lo que el análisis combinado podría potenciar el efecto de ambas variantes. Teniendo en cuenta que los genotipos de ambos polimorfismos se han vinculado con una expresión de la proteína survivina más baja, ambos podrían contribuir conjuntamente a una reducción en el riesgo de desarrollar cáncer de próstata.

Tabla 72. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs8073069-rs9904341 (*BIRC5*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*P*
GG-GG	38 (15,77)	28 (14,89)	GG-GG vs. -	1,07	0,63-1,82	0,803
GG-CG	55 (22,82)	60 (31,91)	GG-CG vs. -	0,63	0,41-0,97	**0,035**
GG-CC	44 (18,26)	23 (12,23)	GG-CC vs. -	1,60	0,93-2,76	0,088
CG-GG	48 (19,92)	35 (18,62)	CG-GG vs. -	1,09	0,67-1,77	0,735
CG-CG	35 (14,52)	30 (15,96)	CG-CG vs. -	0,89	0,53-1,52	0,681
CG-CC[b]	0 (0)	0 (0)	CC-GG vs. -	1,40	0,67-2,92	0,369
CC-GG	21 (8,71)	12 (6,38)				
CC-CG[b]	0 (0)	0 (0)	GG-CC vs. GG-CG	2,09	1,13-3,88	**0,020**
CC-CC[b]	0 (0)	0 (0)	GG-CG vs. GG-CC	0,48	0,26-0,89	**0,020**

[a]Orden de combinación genotípica: rs8073069G>C-rs9904341G>C.
[b]Combinaciones genotípicas excluidas del análisis.

5.7. *TP53* Y *MDM2*.

5.7.1. rs1042522 (*TP53*).

Las frecuencias genotípicas y alélicas del rs1042522 se muestran en la Tabla 73. Se observa una distribución similar en la subpoblación de pacientes e individuos control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de casos y controles (t_s= 0,176; *p*= 0,861). En el grupo de individuos control las frecuencias genotípicas no difieren de lo esperado en una situación de equilibrio genético (χ^2= 0,042; *p*= 0,850). La variante alélica C es la minoritaria (0,226 en casos y 0,231 en controles), con una frecuencia ligeramente inferior a la encontrada en población europea (0,240-0,310) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*).

Tabla 73. Distribución genotípica y alélica del rs1042522 (*TP53*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
GG	152 (60,80)	116 (58,88)	G	0,774 ± 0,019	0,769 ± 0,021
GC	83 (33,20)	71 (36,04)	C	0,226 ± 0,019	0,231 ± 0,021
CC	15 (6,00)	10 (5,08)			
$\hat{h}$				0,351 ± 0,029	0,357 ± 0,032
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,042 (0,850)				
Estadístico t_s (*p*)				0,176 (0,861)	

En la Tabla 74 se muestra el análisis de asociación de este polimorfismo con el PCa. No se observa un efecto diferencial de las variantes del rs1042522 en el inicio del cáncer de próstata a nivel global, con resultados muy próximos a la neutralidad y alejados de la significación estadística. Aun así, los resultados parecen sugerir que el alelo C es el de riesgo, especialmente cuando se encuentra en homocigosis (CC), lo cual es coherente con lo descrito mayoritariamente en otros tipos de cáncer, como cáncer de mama (Ayoubi *et al*., 2018; Hossain *et al*., 2017), carcinoma colorrectal (Elsaid *et al*., 2019; Rivu *et al*., 2017), leucemia (Basabaeen *et al*., 2019; Bilous *et al*., 2017) o neuroblastoma (He *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2019).

Los resultados de este estudio también están en concordancia con lo obtenido en otros trabajos con carcinoma prostático en población chilena (Quiñones *et al*., 2006), japonesa (Suzuki *et al*., 2003) o taiwanesa (Wu *et al*., 2004), aunque en este tipo tumoral los resultados no son concluyentes, ya que algunos estudios desvelan un aumento en el riesgo para portadores de la variante G (Henner *et al*., 2001; Ricks-Santi *et al*., 2010; Xu *et al*., 2010; Xue *et al*., 2016).

Tabla 74. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
CC vs. GG	1,14	0,50-2,64	0,751	0,98	0,41-2,32	0,958
CC vs. GC	1,28	0,54-3,04	0,570	1,23	0,50-3,00	0,653
GC vs. GG	0,89	0,60-1,33	0,574	0,78	0,52-1,19	0,252
Dominante						
CC+GC vs. GG	0,92	0,63-1,35	0,681	0,81	0,55-1,21	0,302
Recesivo						
CC vs. GC+GG	1,19	0,52-2,72	0,673	1,06	0,45-2,48	0,898
Sobredominante						
GC vs. CC+GG	0,88	0,60-1,31	0,530	0,79	0,53-1,19	0,261
Alélico						
C vs. G	0,97	0,71-1,33	0,861	0,88	0,63-1,21	0,430

[a]Análisis ajustado por edad.

Los intervalos de mayor impacto en el análisis de asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata estratificando en función de las tres variables de estudio se muestran en la Tabla 75. Aunque a nivel global los resultados apenas son reseñables, en el análisis de estratificación se observan *Odds Ratios* elevados en varios estratos de la muestra, lo cual denota la influencia del entorno celular a la hora de poner de manifiesto el efecto diferencial de una variante alélica del rs1042522 sobre la otra en el inicio del cáncer de próstata.

En este sentido, el impacto de este marcador en la enfermedad se manifiesta especialmente cuando se estratifica la muestra por edad, encontrando resultados estadísticamente significativos. Así, en los individuos con una edad igual o superior a los 71 años se observa un OR de 6,91 en la comparación CC vs. GG, un OR de 8,13 en la CC vs. GC o un OR de 7,30 en el modelo recesivo (CC vs. CG+GG). En otras palabras, los varones de este rango etario portadores del alelo C en homocigosis exhiben una predisposición al carcinoma prostático hasta 8 veces mayor que aquellos del mismo rango de edad pero con la variante alélica G, tanto en homocigosis como en heterocigosis.

En la Figura 78 se observa, además, un incremento progresivo en el riesgo que comporta el genotipo CC a medida que se produce el envejecimiento, especialmente en aquellas personas con una edad muy avanzada. De este modo, la eficacia funcional de las variantes del rs1042522 no parece ser diferente en personas con una edad inferior a los 68 años. Sin embargo, a partir de esta edad el estrés celular asociado al envejecimiento podría condicionar a una susceptibilidad diferencial de los individuos al desarrollo de la enfermedad en función de su dotación genotípica, asociándose los individuos carentes de alelo protector G con el máximo riesgo al PCa.

A medida que se produce el envejecimiento existe un aumento del estrés oxidativo, lo cual puede generar daños en el ADN. Este hecho, sumado a que los procesos de reparación del ADN tienden a disminuir con el envejecimiento, especialmente durante la última etapa de la vida, contribuye a una mayor probabilidad de mutaciones que, de no ser eliminadas por el organismo, favorecen la carcinogénesis. Se ha visto que la eficiencia del supresor tumoral p53 disminuye con el envejecimiento, permitiendo el incremento en la tasa de mutaciones, debido a una

disminución en la reparación del ADN, y la fijación de las mismas, debido a un descenso de la apoptosis. Esto podría explicar la mayor probabilidad del proceso carcinogénico en individuos ancianos (Feng *et al*., 2007; Feng, Hu, Rajagopal & Levine, 2008).

Teniendo en cuenta que la variante G (Arg) de este polimorfismo se ha asociado con una supresión de la transformación celular más elevada debido a una mayor capacidad de inducción de la apoptosis a través de diferentes mecanismos (Bergamaschi *et al*., 2006; Dumont *et al*., 2003; Jeong *et al*., 2010; Pim & Banks, 2004; Thomas *et al*., 1999), es posible que los individuos portadores del genotipo CC (ProPro) pudieran presentar una menor respuesta apoptótica del p53 ante un daño genotóxico causado por el envejecimiento, llevando a una mayor susceptibilidad carcinogénica.

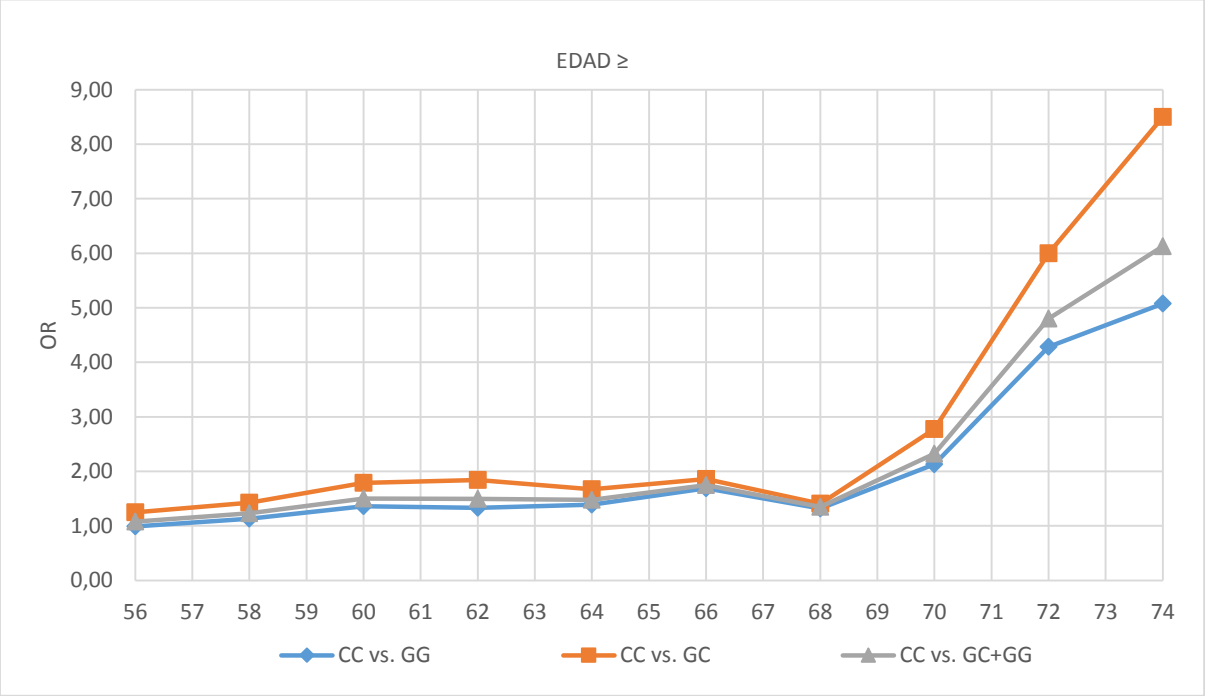

Figura 78. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*TP53*-rs1042522).

En cuanto al tabaquismo o el IMC, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las variantes genotípicas en ninguno de los intervalos analizados. Sin embargo, el efecto diferencial de las variantes parece acentuarse más en los individuos no fumadores o con un consumo tabáquico bajo (<10 py) así como en los que presentan un índice de masa corporal igual o superior a 28. En estas categorías, el riesgo de portar el genotipo CC se triplica en comparación con llevar la variante alélica G.

Tabla 75. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	GG	118	66	CC vs. GG	0,56	0,21-1,47	0,236
<71	GC	65	45	CC vs. GC	0,69	0,25-1,88	0,469
	CC	9	9	CC vs. GC+GG	0,61	0,24-1,56	0,300
	GG	34	47	CC vs. GG	6,91	0,99-48,05	**0,049**
≥71	GC	16	26	CC vs. GC	8,13	1,12-59,20	**0,037**
	CC	5	1	CC vs. GC+GG	7,30	1,10-48,55	**0,039**
Tabaquismo (PY)							
	GG	43	29	CC vs. GG	1,35	0,23-7,90	0,738
No fumadores	GC	27	29	CC vs. GC	2,15	0,37-12,47	0,390
	CC	4	2	CC vs. GC+GG	1,66	0,30-9,28	0,564
	GG	108	83	CC vs. GG	1,10	0,40-3,01	0,856
Fumadores	GC	52	42	CC vs. GC	1,15	0,40-3,30	0,789
	CC	10	7	CC vs. GC+GG	1,12	0,41-3,02	0,828
	GG	59	53	CC vs. GG	3,14	0,67-14,81	0,146
<10	GC	37	39	CC vs. GC	3,69	0,78-17,53	0,099
	CC	7	2	CC vs. GC+GG	3,35	0,74-15,29	0,117
	GG	92	59	CC vs. GG	0,64	0,21-1,91	0,425
≥10	GC	45	32	CC vs. GC	0,76	0,24-2,40	0,640
	CC	7	7	CC vs. GC+GG	0,68	0,23-2,00	0,481
IMC							
	GG	63	37	CC vs. GG	1,47	0,27-7,95	0,654
<28	GC	43	19	CC vs. GC	1,10	0,19-6,28	0,910
	CC	5	2	CC vs. GC+GG	1,32	0,25-7,03	0,744
	GG	79	49	CC vs. GG	2,48	0,53-11,69	0,249
≥28	GC	34	33	CC vs. GC	3,88	0,83-18,18	0,083
	CC	8	2	CC vs. GC+GG	2,90	0,64-13,19	0,167

Por lo tanto, no se observan resultados estadísticamente significativos al valorar la interacción de este polimorfismo con el tabaquismo o el índice de masa corporal. No obstante, los elevados valores de *Odds Ratio* obtenidos cuando se compara la clase genotípica CC con las otras dos nos indican que no se trata de un error de muestreo sino que la ausencia de significación es más consecuencia del bajo grado de polimorfismo que presenta el marcador. Este hecho condiciona una frecuencia baja del genotipo CC, especialmente cuando se divide la muestra en función de las diferentes variables de estudio, resultando en la ausencia de significación por el carácter conservativo de los estadísticos aplicados.

Esta tendencia se confirma al valorar la interacción conjunta de las tres variables de estudio en el cáncer de próstata (Tabla 76). De este modo, aunque se obtiene un riesgo de cáncer notablemente superior para los individuos con el genotipo CC cuando el entorno celular es desfavorable, especialmente en aquellos con una edad avanzada (≥71) y con sobrepeso (≥28), los valores de *p* no alcanzan la significación estadística.

Tabla 76. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
EDAD ≥71 & IMC ≥28	GG	13	19	CC vs. GG	5,71	0,68-48,01	0,104
	GC	6	13	CC vs. GC	8,00	0,90-71,46	0,058
	CC	3	0	CC vs. GC+GG	6,48	0,85-49,48	0,069
EDAD ≥71 & PY <10	GG	14	23	CC vs. GG	4,80	0,53-43,54	0,158
	GC	5	12	CC vs. GC	6,50	0,64-66,10	0,106
	CC	2	0	CC vs. GC+GG	5,29	0,62-44,73	0,123
IMC ≥28 & PY <10	GG	28	21	CC vs. GG	4,55	0,59-35,28	0,143
	GC	15	15	CC vs. GC	6,00	0,76-47,13	0,084
	CC	5	0	CC vs. GC+GG	5,07	0,70-36,71	0,106

5.7.2. rs2279744 (*MDM2*).

La distribución de frecuencias genotípicas y alélicas de este marcador se presentan en la Tabla 77. La muestra de los individuos control se ajusta a los requisitos asumidos según el equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 0,368; *p*= 0,550). El alelo G es el minoritario, con frecuencias parecidas en casos (0,331) y controles (0,334). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambas frecuencias utilizando un test t_s (*p*= 0,928). En población europea el alelo G también es el minoritario, con frecuencias muy similares a las encontradas en población de Galicia (0,280-0,440) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). La heterocigosidad esperada es alta para este polimorfismo en ambos subgrupos (0,445 en casos y 0,447 en controles).

Tabla 77. Distribución genotípica y alélica del rs2279744 (*MDM2*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
TT	112 (45,53)	85 (43,37)	T	0,669 ± 0,021	0,666 ± 0,024
GT	105 (42,68)	91 (46,43)	G	0,331 ± 0,021	0,334 ± 0,024
GG	29 (11,79)	20 (10,20)			
$\hat{h}$				0,445 ± 0,020	0,447 ± 0,023
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,368 (0,550)				
Estadístico t_s (*p*)				0,090 (0,928)	

No se encuentra asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y el cáncer de próstata bajo ningún modelo genético analizado al valorar los datos procedentes de la muestra total de individuos (Tabla 78). Aunque los resultados apuntan claramente a la ausencia de impacto de las variantes de este polimorfismo sobre el desarrollo de la enfermedad, se podría vincular un leve efecto de riesgo para los individuos portadores del alelo G en homocigosis y un cierto efecto protector para aquellos con la variante alélica T.

Nuestros resultados son coherentes con la mayoría de estudios llevados a cabo en otros tipos de cáncer, donde se encuentra mayoritariamente un efecto de riesgo para la variante G, especialmente en homocigosis, tales como el carcinoma de laringe (Fernández-Mateos *et al*., 2019), el de pulmón (Li *et al*., 2017), el gástrico (Tas *et al*., 2017), el de esófago (Xiao *et al*., 2019), el de mama (Yilmaz *et al*., 2018) o el colorrectal (Yueh *et al*., 2018). Estos hallazgos están en concordancia con los estudios de expresión, en los cuales el genotipo GG se vincula con un aumento en los niveles de ARNm y proteína MDM2, debido a la creación de un sitio de unión al factor de transcripción Sp1 en el promotor P2 (Bond *et al*., 2004; Knappskog *et al*., 2012). Puesto que el MDM2 es un factor inhibidor del supresor tumoral p53, esta variante se asociaría con un aumento en el riesgo de cáncer.

Por el contrario, los resultados descritos en este estudio no concuerdan con los encontrados en otros trabajos de cáncer de próstata, ya que se desvela un efecto protector para el alelo G en varias poblaciones de origen Caucasoide (Kibel *et al*., 2008; Mandal & Mittal, 2012), especialmente frente al cáncer de inicio temprano (Kibel *et al*., 2008; Sun *et al*., 2010).

Tabla 78. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. TT	1,10	0,58-2,08	0,768	1,06	0,55-2,03	0,873
GG vs. GT	1,26	0,67-2,37	0,480	1,23	0,64-2,38	0,530
GT vs. TT	0,88	0,59-1,30	0,513	0,86	0,56-1,29	0,458
Dominante						
GG+GT vs. TT	0,92	0,63-1,34	0,650	0,89	0,60-1,32	0,568
Recesivo						
GG vs. GT+TT	1,18	0,64-2,15	0,598	1,14	0,61-2,13	0,677
Sobredominante						
GT vs. GG+TT	0,86	0,59-1,25	0,431	0,85	0,57-1,25	0,404
Alélico						
G vs. T	0,99	0,74-1,31	0,928	0,97	0,72-1,29	0,820

[a]Análisis ajustado por edad.

El análisis de la relación del polimorfismo con el cáncer de próstata estratificando en función de las tres variables de estudio se muestra en la Tabla 79. Al contrario de lo que sucede en el estudio global de la muestra, valorando la interacción del rs2279744 con distintos factores del entorno celular, el efecto diferencial de las variantes a la hora de iniciar la carcinogénesis se pone de manifiesto, revelándose valores de OR elevados en algunos intervalos de la estratificación.

Al estratificar la muestra en función de la edad no se encuentran resultados estadísticamente significativos. Aun así, los resultados parecen sugerir que el rs2279744 es un marcador de inicio temprano, ya que la mayor predisposición al cáncer se encuentra en los individuos jóvenes (<61 años). Portar el alelo G de este marcador en homocigosis podría acelerar el establecimiento de un cáncer de próstata en tanto que el riesgo se triplica en comparación con llevar al menos una copia del alelo T (OR= 3,18).

Apoyando nuestros resultados, la variante G se ha relacionado con una mayor inhibición del p53 y la aceleración del proceso carcinogénico (Bond *et al*., 2004). Se ha visto, además, que los individuos con el síndrome de *Li-Fraumeni*, con un alelo mutado del *TP53* en línea germinal, portadores del alelo G del rs2279744, desarrollan cáncer de 7 a 10 años antes que los sujetos que son homocigotos para el alelo T (Bougeard *et al*., 2006).

La asociación entre el polimorfismo y la carcinogénesis prostática tampoco resulta significativa tras estratificar la muestra en función del tabaquismo. No obstante, los resultados sugieren que los coadyuvantes del tabaco podrían tener una interacción con el rs2279744, en tanto que los varones fumadores con la variante genotípica GG parecen presentar un aumento en el riesgo a desarrollar este cáncer en comparación con aquellos no fumadores. Al subdividir la muestra de los individuos fumadores, se observa un máximo impacto en aquellos que fuman una cantidad moderada de tabaco (OR= 2,60).

Por lo tanto, aunque en el análisis de la muestra estratificada por edad o tabaquismo se obtienen valores de OR de alto impacto en los sujetos carentes del alelo T, no se alcanza la

significación estadística en nigún intervalo. Esto puede ser consecuencia del bajo tamaño muestral de la variante genotípica GG, la que indica riesgo, cuando la población es dividida en función de los distintos factores ambientales.

El mayor impacto de las variantes de este marcador en el desarrollo del cáncer de próstata se manifiesta al valorar la interacción con el índice de masa corporal, revelándose valores estadísticamente significativos. Así, los individuos con sobrepeso (IMC= 25-29,99) portadores del alelo G en homocigosis presentan el doble de riesgo de padecer la enfermedad con respecto de portadores del alelo T (OR= 2,97; *p*= 0,047). La susceptibilidad asociada a los sujetos con el genotipo GG llega a ser casi cuatro veces superior que la de aquellos con el genotipo homocigoto TT (OR= 3,27; *p*= 0,036).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 79. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	TT	30	9	GG vs. TT	2,70	0,31-23,15	0,360
<61	GT	21	9	GG vs. GT	3,86	0,46-32,08	0,206
	GG	9	1	GG vs. GT+TT	3,18	0,41-24,66	0,266
	TT	80	74	GG vs. TT	0,97	0,48-1,97	0,941
≥61	GT	83	81	GG vs. GT	1,03	0,51-2,07	0,940
	GG	20	19	GG vs. GT+TT	1,00	0,51-1,95	0,998
Tabaquismo (PY)							
	TT	36	23	GG vs. TT	0,64	0,22-1,85	0,406
No fumadores	GT	27	28	GG vs. GT	1,04	0,36-3,03	0,947
	GG	9	9	GG vs. GT+TT	0,81	0,30-2,20	0,677
	TT	72	59	GG vs. TT	1,49	0,66-3,36	0,334
Fumadores	GT	76	61	GG vs. GT	1,46	0,65-2,49	0,358
	GG	20	11	GG vs. GT+TT	1,47	0,68-3,19	0,324
	TT	33	23	GG vs. TT	2,32	0,58-9,23	0,228
>0-<25	GT	26	23	GG vs. GT	2,95	0,74-11,70	0,121
	GG	10	3	GG vs. GT+TT	2,60	0,70-9,67	0,152
	TT	39	36	GG vs. TT	1,15	0,41-3,26	0,786
≥25	GT	50	38	GG vs. GT	0,95	0,34-2,65	0,922
	GG	10	8	GG vs. GT+TT	1,04	0,39-2,78	0,938
IMC							
	TT	15	7	GG vs. TT	0,93	0,13-6,59	0,944
<25	GT	20	12	GG vs. GT	1,20	0,19-7,75	0,846
	GG	4	2	GG vs. GT+TT	1,09	0,18-6,58	0,928
	TT	55	36	GG vs. TT	3,27	1,07-9,97	**0,036**
25-29,99	GT	51	27	GG vs. GT	2,65	0,84-8,33	0,095
	GG	20	4	GG vs. GT+TT	2,97	1,01-8,74	**0,047**
	TT	31	21	GG vs. TT	0,54	0,13-2,25	0,395
≥30	GT	28	27	GG vs. GT	0,77	0,19-3,21	0,719
	GG	4	5	GG vs. GT+TT	0,65	0,17-2,55	0,536

El impacto de las variantes alélicas del rs2279744 sale a la luz más claramente en los individuos que presentan sobrepeso y, además, son fumadores, manifestando un riesgo casi 5 veces superior los portadores del genotipo GG que aquellos con el alelo T, tanto en homocigosis como en heterocigosis (OR= 4,54, *p*= 0,036) (Tabla 80).

El sobrepeso y el tabaquismo son factores que generan un estrés celular y pueden incrementar la probabilidad de transformación maligna. Los individuos portadores del genotipo GG tendrían una mayor expresión del proto-oncogén *MDM2* debido a una mayor unión del factor de transcripción Sp1, lo que permitiría ejercer un efecto inhibitorio más fuerte sobre el supresor tumoral p53. De este modo, no habría suficiente cantidad de proteína p53 para reparar o eliminar células con mutaciones potencialmente cancerígenas causadas por una alta presión de adipokinas pro-inflamatorias o por agentes carcinogénicos del tabaco, aumentando el riesgo de sufrir un proceso oncogénico.

Tabla 80. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
IMC 25-29,99 &	TT	35	22	GG vs. TT	4,71	1,08-20,61	**0,038**
PY >0	GT	36	21	GG vs. GT	4,38	0,99-19,32	**0,050**
	GG	15	2	GG vs. GT+TT	4,54	1,10-18,73	**0,036**
IMC 25-29,99 &	TT	16	5	GG vs. TT	2,47	0,25-24,06	0,429
EDAD <61	GT	9	2	GG vs. GT	2,10	0,17-25,23	0,549
	GG	6	0	GG vs. GT+TT	2,33	0,26-21,09	0,445
EDAD <61 &	TT	19	6	GG vs. TT	2,21	0,23-21,61	0,489
PY >0	GT	18	6	GG vs. GT	2,33	0,24-22,77	0,459
	GG	7	1	GG vs. GT+TT	2,27	0,26-19,76	0,454

5.7.3. rs937283 (*MDM2*).

En la Tabla 81 se detalla la distribución genotípica y alélica del rs937283 en nuestra muestra poblacional. Las frecuencias genotípicas encontradas en el subgrupo de controles no difieren de las esperadas en una situación de equilibrio genético (χ^2= 2,580; *p*= 0,100). El alelo minoritario es el G, con una distribución similar en casos (0,380) y en controles (0,367), no encontrando diferencias significativas entre ambas frecuencias (t_s= 0,450; *p*= 0,652). La distribución de este alelo entra dentro del rango de variación de otras poblaciones de ancestralidad europea, oscilando entre un valor de 0,310 y de 0,490. (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). La heterocigosidad esperada para este polimorfismo es alta en ambos subgrupos poblacionales (0,473 en casos y 0,466 en controles).

Tabla 81. Distribución genotípica y alélica del rs937283 (*MDM2*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	114 (39,58)	92 (37,70)	A	0,620 ± 0,020	0,633 ± 0,022
GA	129 (44,79)	125 (51,23)	G	0,380 ± 0,020	0,367 ± 0,022
GG	45 (15,63)	27 (11,07)			
$\hat{h}$				0,473 ± 0,014	0,466 ± 0,017
Eq. H-W x^2 (*p*)	2,580 (0,100)				
Estadístico t_s (*p*)				0,450 (0,652)	

En la Tabla 82 se muestra la asociación de este polimorfismo con el cáncer de próstata. No se observan resultados estadísticamente significativos en ninguno de los modelos genéticos analizados. Sin embargo, los individuos con el genotipo GG parecen presentar un incremento en el riesgo de PCa con respecto de aquellos portadores del heterocigoto GA, con resultados próximos a la significación estadística (OR_{BRUTO}= 1,61, *p*= 0,079; $OR_{AJUSTADO}$= 1,69; *p*= 0,061). El riesgo de los individuos homocigotos GG también es superior que el de los homocigotos AA (OR= 1,35), de modo que en el modelo recesivo se obtiene un incremento del 49% para los sujetos con el genotipo GG con respecto de portadores del alelo A.

No obstante, el efecto de los genotipos AA y GA no es equivalente, sino que los individuos homocigotos AA muestran un aumento en la susceptibilidad con respecto de aquellos GA (OR= 1,20). En el modelo sobredominante se observa un 29% más de riesgo para los individuos AA o GG en comparación con los GA. El efecto de ambos homocigotos sobre el heterocigoto es inferior que el ejercido exclusivamente por el genotipo GG. De este modo, el rs937283 no parece ajustarse a ningún modelo en concreto, sino que se observa un efecto de riesgo máximo para el genotipo GG, tanto con respecto de AA como de GA, pero el riesgo del genotipo AA es superior que el de GA.

Los individuos portadores del genotipo heterocigoto GA parecen presentar, por lo tanto, un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de próstata en todos los modelos genéticos. Este genotipo debe suponer algún tipo de ventaja funcional que compensa la disfuncionalidad de GG y AA. Esto permite que el homocigoto GG se mantenga en la población, aun siendo el

genotipo que se asocia con la mayor expresión del gen *MDM2* (Jiao *et al*., 2016) y con el máximo riesgo de carcinogénesis prostática.

Este estudio es el primero en valorar la influencia de las variantes del rs937283 en el cáncer de próstata, por lo que sería interesante poder contrastar los resultados obtenidos con los derivados de otras poblaciones de diverso trasfondo genético. Por lo que respecta a otros tipos de cáncer, se desvela sistemáticamente un efecto de riesgo para la variante G, tal es el caso del retinoblastoma (Jiao *et al*., 2016), el carcinoma de mama (Chen *et al*., 2018), el de hígado (Chen *et al*., 2018), el de pulmón (Chen *et al*., 2018), el cáncer oral (Chen *et al*., 2010) y cáncer de laringe (Wang & Ma, 2015). En estos trabajos el impacto del alelo G se manifiesta especialmente en portadores del genotipo homocigoto GG, lo cual es coherente con lo descrito en este estudio en tanto que su impacto en el PCa es superior al del alelo A.

Tabla 82. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	1,35	0,78-2,33	0,291	1,37	0,78-2,39	0,276
GG vs. GA	1,61	0,95-2,76	0,079	1,69	0,98-2,92	0,061
AA vs. GA	1,20	0,83-1,74	0,331	1,24	0,85-1,80	0,264
Dominante						
GG+GA vs. AA	0,92	0,65-1,31	0,658	0,90	0,63-1,29	0,579
Recesivo						
GG vs. GA+AA	1,49	0,89-2,48	0,126	1,53	0,91-2,58	0,107
Sobredominante						
GG+AA vs. GA	1,29	0,92-1,82	0,139	1,34	0,95-1,89	0,100
Alélico						
G vs. A	1,06	0,83-1,36	0,653	1,06	0,82-1,36	0,680

[a]Análisis ajustado por edad.

La relación del polimorfismo con el PCa estratificando la muestra en función de las distintas variables de estudio se plasma en la Tabla 83. Puesto que no se han obtenido resultado significativos en el estudio a nivel global, el análisis de estratificación puede ayudar a esclarecer el comportamiento del marcador en relación a la carcinogénesis. Teniendo en cuenta el efecto diferencial que cada genotipo parece ejercer en referencia al inicio de la enfermedad, el análisis de estratificación se ha valorado utilizando el modelo codominante.

Los individuos menores de 57 años y portadores del genotipo GG manifiestan un riesgo más de 7 veces superior de sufrir cáncer de próstata que aquellos que son heterocigotos para este marcador, obteniendose resultados claramente significativos (OR= 7,20, *p*= 0,016). Aunque no se desvela suficiente evidencia estadística, también se observa un aumento en el riesgo en comparación con los portadores del genotipo AA (OR= 3,60). Estos resultados también aparecen reflejados en la Figura 79, observándose un impacto del genotipo GG mucho más acusado en varones jóvenes, especialmente en referencia a portadores de GA. De este modo, los resultados parecen indicar que el genotipo GG se asociaría con una formación del tumor más acelerada en tanto que a medida que se van incluyendo individuos de una edad más avanzada se observa una menor diferencia en el riesgo que comporta una u otra variante genotípica.

El alelo G del rs2279744 se ha asociado con una formación del cáncer más temprana causando el aumento en la expresión del gen *MDM2* debido a su posición en la región promotora (Bond *et al*., 2004). Teniendo en cuenta que el rs937283 también se localiza en la región promotora del gen *MDM2*, asociándose el alelo G con una mayor expresión génica (Jiao *et al*., 2016) y, por lo tanto, con una mayor inhibición de la proteína supresora tumoral p53, existe la posibilidad de que contribuya a un aceleración del proceso de formación tumoral igual que ocurría en el caso del alelo G del rs2279744. No obstante, esta hipótesis debe ser validada en el futuro.

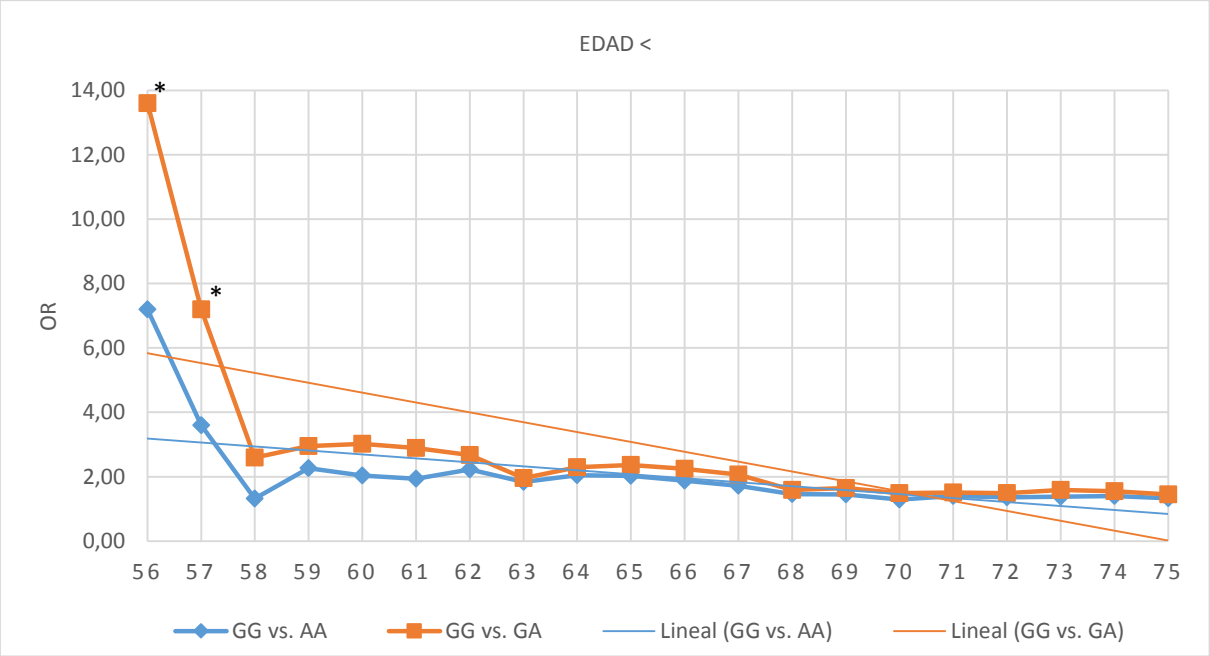

Figura 79. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*MDM2*-rs937283). *Valores estadísticamente significativos usando un test x^2 ($p<0,05$).

En referencia al tabaquismo (Tabla 83), el efecto diferencial de las variantes se pone de manifiesto especialmente en los varones consumidores de hasta 36 *pack-years*, presentando aquellos con el genotipo GG la máxima susceptibilidad a la enfermedad en comparación con los GA, con un riesgo casi tres veces superior (OR= 2,57; *p*= 0,037).

Los sujetos con el alelo A podrían presentar una mayor capacidad a la hora de reparar daños en el ADN causados por los carcinógenos del tabaco, en tanto que se asociarían con un menor efecto inhibitorio del MDM2 sobre el p53, desembocando en una menor susceptibilidad al cáncer de próstata.

En cuanto a la interacción del polimorfismo con el índice de masa corporal, se obtienen valores de alto impacto y estadísticamente significativos en los individuos con obesidad elevada (≥33), alcanzando un riesgo hasta 8 veces superior los portadores del genotipo GG que aquellos con el heterocigoto GA (OR= 8,00; *p*= 0,040). También se desvela una mayor susceptibilidad para los varones con este genotipo en comparación con aquellos con el homocigoto AA (OR= 5,60), pero no se obtiene suficiente evidencia estadística.

El supresor tumoral p53 desempeña un amplio rango de funciones en el metabolismo y la homeostasis del tejido adiposo (Krstic, Reinisch, Schupp, Schulz & Prokesch, 2018; Zwezdaryk, Sullivan & Saifudeen, 2018), por lo que una desregulación de sus niveles debido a un cambio en la expresión del gen *MDM2* determinado por las variantes de este polimorfismo podrían condicionar una susceptibilidad diferencial al proceso carcinogénico.

Tabla 83. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	AA	10	9	GG vs. AA	3,60	0,61-21,13	0,149
<57	GA	10	18	GG vs. GA	7,20	1,41-36,70	**0,016**
	GG	8	2	AA vs. GA	2,00	0,61-6,59	0,250
	AA	102	82	GG vs. AA	1,21	0,67-2,18	0,536
≥57	GA	114	106	GG vs. GA	1,39	0,78-2,49	0,260
	GG	36	24	AA vs. GA	1,16	0,78-1,71	0,468
Tabaquismo (PY)							
	AA	31	34	GG vs. AA	1,92	0,71-5,18	0,196
No fumadores	GA	42	33	GG vs. GA	1,38	0,51-3,68	0,524
	GG	14	8	AA vs. GA	0,72	0,37-1,40	0,326
	AA	80	55	GG vs. AA	1,11	0,56-2,19	0,769
Fumadores	GA	84	91	GG vs. GA	1,75	0,91-3,36	0,095
	GG	29	18	AA vs. GA	1,58	1,00-2,48	**0,049**
	AA	41	28	GG vs. AA	1,79	0,70-4,61	0,223
>0-<36	GA	49	48	GG vs. GA	2,57	1,05-6,28	**0,037**
	GG	21	8	AA vs. GA	1,43	0,77-2,68	0,256
	AA	39	27	GG vs. AA	0,55	0,19-1,58	0,267
≥36	GA	35	43	GG vs. GA	0,98	0,35-2,77	0,974
	GG	8	10	AA vs. GA	1,77	0,91-3,44	0,089
IMC							
	AA	91	61	GG vs. AA	0,98	0,52-1,84	0,938
<33	GA	98	85	GG vs. GA	1,26	0,68-2,34	0,459
	GG	32	22	AA vs. GA	1,29	0,84-2,00	0,246
	AA	10	7	GG vs. AA	5,60	0,63-49,50	0,114
≥33	GA	13	13	GG vs. GA	8,00	1,07-59,99	**0,040**
	GG	8	1	AA vs. GA	1,43	0,41-4,97	0,571

La asociación del polimorfismo con la predisposición al cáncer de próstata valorando la interacción entre las variables de estudio se muestra en la Tabla 84. El efecto de riesgo del genotipo GG se acentúa notablemente entre los varones jóvenes (<57 años) y fumadores, alcanzando una susceptibilidad al PCa hasta 10 veces superior en comparación con los sujetos con el genotipo GA (OR= 10,71; *p*= 0,024). En los individuos con estas características, presentar una menor capacidad de reparación de tales daños debido a una mayor inhibición de la proteína p53 causada por una mayor expresión del gen *MDM2* asociada al genotipo GG podría suponer un riesgo a desarrollar cáncer de próstata mucho más acusado.

Tabla 84. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
EDAD <57 &	AA	8	6	GG vs. AA	3,89	0,38-39,44	0,240
PY >0	GA	6	14	GG vs. GA	10,71	1,32-87,00	**0,024**
	GG	4	0	AA vs. GA	2,76	0,72-10,49	0,132
IMC ≥33 &	AA	8	6	GG vs. AA	3,75	0,35-39,79	0,260
PY >0	GA	9	12	GG vs. GA	6,67	0,76-58,11	0,080
	GG	5	1	AA vs. GA	1,78	0,45-7,07	0,407

5.7.4. rs937283 - rs2279744 (*MDM2*).

Los polimorfismos rs937283 y rs2279744 se sitúan en el promotor 1 (-2164A>G) y en el promotor 2 (-410T>G) del gen *MDM2*, respectivamente. Esto abre la posibilidad de que los polimorfismos no segreguen de forma independiente. Los resultados derivados de nuestra muestra poblacional desvelan un coeficiente de *Lewontin* elevado (D´= 0,939), pero un coeficiente de correlación relativamente bajo (r^2= 0,265) (Figura 80). Estos polimorfismos no presentan, por lo tanto, un desequilibrio de ligamiento completo sino que se produce cierto grado de recombinación genética entre ellos.

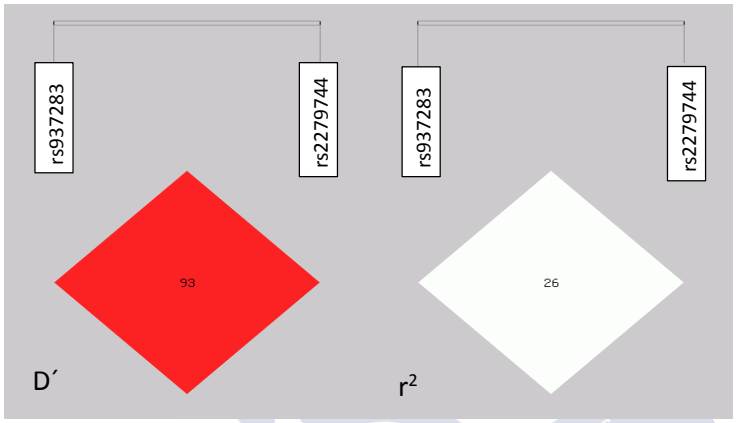

Figura 80. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs937283 y rs2279744 del *locus MDM2*.

La distribución de las frecuencias de los haplotipos formados por los polimorfismos rs937283-rs2279744 y su asociación con el cáncer de próstata se muestra en la Tabla 85. La frecuencia del haplotipo formado por el alelo G del SNP rs937283 y el alelo G del rs2279744 es inferior al 3% por lo que queda excluido del análisis.

No se ha encontrado asociación significativa entre los haplotipos formados por estos polimorfismos y el riesgo a desarrollar PCa. Los individuos portadores del haplotipo A-T parecen manifestar un efecto protector frente a los portadores de los otros dos (OR= 0,85). Esto implica que los individuos con el haplotipo G-T o A-G presentarían un 18% de aumento en el riesgo de PCa (OR= 1,18). No se observa un efecto diferencial del haplotipo G-T sobre el A-G y viceversa ($OR_{G\text{-}T/A\text{-}G}$= 1,05; $OR_{A\text{-}G/G\text{-}T}$= 0,95), probablemente porque los individuos con cualquiera de esos haplotipos son portadores de un alelo de riesgo.

Tabla 85. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs937283 (*MDM2*)-rs2279744 (*MDM2*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
G-T	0,398	0,369	G-T vs. A-G	1,05	0,76-1,44	0,769
			G-T vs. A-T	1,20	0,86-1,67	0,278
A-G	0,334	0,325	G-T vs. -	1,12	0,85-1,47	0,433
A-T	0,268	0,299				
			A-G vs. G-T	0,95	0,69-1,31	0,769
G-G[b]	0,000	0,008	A-G vs. A-T	1,14	0,81-1,61	0,437
			A-G vs. -	1,03	0,78-1,37	0,835
			A-T vs. G-T	0,83	0,60-1,16	0,278
			A-T vs. A-G	0,87	0,62-1,23	0,437
			A-T vs. -	0,85	0,63-1,14	0,287

[a]Orden de haplotipo: rs937283A>G (*MDM2*)-rs2279744T>G (*MDM2*).
[b]Haplotipos con una frecuencia inferior a 0,030 quedan excluidos del análisis.

La distribución de frecuencias correspondientes a las combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs937283-rs2279744 y su asociación con el cáncer de próstata se muestra en la Tabla 86.

Ninguna de las combinaciones genotípicas formadas por estos dos polimorfismos muestra un efecto estadísticamente significativo sobre el desarrollo de cáncer de próstata. No obstante, parece que los individuos portadores de las combinaciones genotípicas AA-GG y GG-TT, cada una de ellas con un genotipo de riesgo, muestran un aumento en la susceptibilidad al PCa con respecto del resto de individuos (OR= 1,32 y OR= 1,55, respectivamente).

Tabla 86. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs937283 (*MDM2*)-rs2279744 (*MDM2*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*P*
AA-TT	18 (7,38)	14 (7,22)	AA-TT vs. -	1,02	0,50-2,12	0,949
AA-GT	45 (18,44)	40 (20,62)	AA-GT vs. -	0,87	0,54-1,40	0,567
AA-GG	29 (11,89)	18 (9,28)	AA-GG vs. -	1,32	0,71-2,45	0,381
GA-TT	50 (20,49)	47 (24,23)	GA-TT vs. -	0,81	0,51-1,27	0,350
GA-GT	60 (24,59)	51 (26,29)	GA-GT vs. -	0,91	0,59-1,41	0,685
GA-GG[b]	0 (0)	0 (0)	GG-TT vs. -	1,55	0,90-2,67	0,117
GG-TT	42 (17,21)	23 (11,86)				
GG-GT[b]	0 (0)	0 (0)				
GG-GG[b]	0 (0)	1 (0,52)				

[a]Orden de combinación genotípica: rs937283A>G (*MDM2*)-rs2279744T>G (*MDM2*).
[b]Combinaciones genotípicas excluidas del análisis.

5.7.5. rs937283 (MDM2) - rs2279744 (MDM2) - rs1042522 (TP53).

El MDM2 funciona como un regulador negativo del supresor tumoral p53, por lo que se ha valorado la influencia en la carcinogenésis prostática de combinaciones genotípicas formadas por polimorfismos localizados en estos genes (Tabla 87).

La valoración conjunta de estos tres polimorfismos desvela combinaciones genotípicas de alto impacto en el desarrollo del PCa. De este modo, se obtiene una susceptibilidad a esta enfermedad máxima para los individuos portadores de la combinación genotípica AA-GG-GC (rs937283-rs2279744-rs1042522). El riesgo de los varones con esta combinación llega a ser cuatro veces mayor que para aquellos GA-TT-GG (OR= 4,80; *p*= 0,041) o hasta cinco veces superior en referencia a los AA-GT-GC (OR= 5,40; *p*= 0,036).

El efecto combinado de estos marcadores en el inicio del cáncer de próstata es muy superior que al analizar cada uno de ellos de forma individual. Estos resultados cobran relevancia si tenemos en cuenta que la función del supresor tumoral p53 depende en gran medida de su estabilidad en la célula, lo cual depende directamente del efecto que el inhibidor MDM2 ejerce sobre él. De este modo, variantes polimórficas en estos genes pueden modular conjuntamente la susceptibilidad al cáncer de próstata.

Otros estudios examinaron la asociación de las combinaciones genotípicas formadas por estos tres polimorfismos y el inicio del cáncer, aunque los resultados son contradictorios y difíciles de comparar. De este modo, los individuos con 2-3 genotipos de riesgo (rs937283AA-rs2279744GG+GT-rs1042522CC), presentaron un aumento en la susceptibilidad al carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello con respecto de individuos portadores de 0 genotipos de riesgo (OR= 1,42) (Yu *et al*., 2011). Por lo que respecta al carcinoma prostático, se ha obtenido

que portadores de 3 a 5 alelos de riesgo (rs937283G-rs2279744G-rs1042522G) presentaban un aumento en la suceptibilidad (OR= 1,56) en comparación con aquellos portadores de 0 a 2 variantes de riesgo (Xu *et al*., 2010).

Tabla 87. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs937283 (MDM2)-rs2279744 (*MDM2)*- rs1042522 (TP*53)* y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*p*
AA-GG-GC	9	2	AA-GG-GC vs. AA-GT-GC	5,40	1,10-26,59	**0,036**
AA-GT-GC	15	18	AA-GG-GC vs. GA-TT-GG	4,80	1,06-21,76	**0,041**
GA-TT-GG	30	32	AA-GT-GC vs. AA-GG-GC	0,19	0,04-0,91	**0,036**
			GA-TT-GG vs. AA-GG-GC	0,21	0,05-0,94	**0,041**

[a]Orden de combinación genotípica: rs937283A>G (*MDM2*)-rs2279744T>G (*MDM2*)-rs1042522G>C (*TP53*).
[b]Combinaciones genotípicas excluidas del análisis.

Estos resultados nos indican que el valor predictivo de un conjunto de marcadores puede ser superior al obtenido en el análisis de un marcador individual. Por otra parte, el efecto de los marcadores no solo se acentúa en el estudio de la interacción gen-gen, sino también valorando la interacción gen-ambiente.

5.8. *CDKN1A* (rs2395655).

En la Tabla 88 se resume la distribución de genotipos y alelos para este marcador. Las frecuencias genotípicas encontradas en la muestra de individuos control no se desvían de lo esperado en situación de equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 2,360; *p*= 0,150). El alelo minoritario es el G, tanto en la muestra de casos (0,492) como de controles (0,475). No obstante, el grado de polimorfismo es muy elevado en nuestra población, con frecuencias similares entre ambos alelos y con valores de heterocigosidad del 50%. La frecuencia del alelo G es ligeramente superior a la encontrada en otras poblaciones de ancestralidad europea (0,340-0,410) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). Las diferencias entre las frecuencias alélicas de casos y controles no son significativas tras la aplicación de un estadístico t_s (*p*= 0,608).

Tabla 88. Distribución genotípica y alélica del rs2395655 (*CDKN1A*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
AA	63 (25,40)	49 (24,87)	A	0,508 ± 0,022	0,525 ± 0,025
AG	126 (50,81)	109 (55,33)	G	0,492 ± 0,022	0,475 ± 0,025
GG	59 (23,79)	39 (19,80)			
$\hat{h}$				0,502 ± 0,003	0,501 ± 0,005
Eq. H-W x^2 (*p*)	2,360 (0,150)				
Estadístico t_s (*p*)				0,513 (0,608)	

En la Tabla 89 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el rs2395655 y el cáncer de próstata. En ninguno de los modelos genéticos analizados se encuentra una asociación estadísticamente significativa y el impacto diferencial de las variantes en la enfermedad es bajo a nivel global. Teniendo esto en cuenta, sí que parecen apreciarse ciertas tendencias. De este modo, el análisis conjunto de la información parece apuntar a un alelo G de riesgo cuando no existe alternativa alélica. En otras palabras, los resultados parecen sugerir un efecto protector frente a este cáncer para los individuos portadores de la variante alélica A.

Este estudio es el primero en valorar la asociación del rs2395655 con el cáncer de próstata, por lo que será relevante poder contrastar los resultados obtenidos con los procedentes de otras poblaciones. Con respecto a otras carcinogénesis, nuestros resultados están en coherencia con lo descrito en carcinoma de esófago (Wang *et al*., 2014; Yang *et al*., 2016) y en cáncer del tracto aerodigestivo superior (Canova *et al*., 2009), en donde se describe un aumento en la predisposición para los sujetos que llevan en el genoma el alelo G de este SNP.

Tabla 89. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. AA	1,18	0,68-2,04	0,562	1,03	0,59-1,82	0,913
GG vs. AG	1,31	0,81-2,11	0,270	1,16	0,70-1,90	0,565
AA vs. AG	1,11	0,71-1,75	0,645	1,13	0,70-1,82	0,615
Dominante						
GG+AG vs. AA	0,97	0,63-1,50	0,898	0,92	0,59-1,44	0,720
Recesivo						
GG vs. AA+AG	1,26	0,80-2,00	0,313	1,11	0,69-1,78	0,667
Sobredominante						
GG+AA vs. AG	1,20	0,82-1,75	0,342	1,14	0,77-1,69	0,504
Alélico						
G vs. A	1,07	0,82-1,40	0,608	1,00	0,76-1,33	0,970

[a]Análisis ajustado por edad.

La asociación de este marcador con el cáncer de próstata estratificando en función de las distintas variables de estudio se muestra en la Tabla 90.

Al estratificar por edad, el impacto de los distintos genotipos del polimorfismo se pone de manifiesto en los sujetos con una edad mayor o igual a 67 años, donde portar el genotipo GG implica un aumento significativo en el riesgo a desarrollar la enfermedad con respecto de aquellos con el genotipo heterocigoto AG (OR= 2,03; *p*= 0,049). Aunque la relación no resulta significativa, también se observa una mayor susceptibilidad para los varones con el genotipo GG con respecto de los individuos homocigotos AA (OR= 1,70) o los portadores del alelo A en general (OR= 1,92).

En cuanto al tabaquismo, se encuentra asociación significativa de las variantes de este polimorfismo con el cáncer de próstata en los varones con un consumo tabáquico elevado (≥36 py), de tal modo que llevar en el genoma ambas copias del alelo G supone el doble de riesgo de padecer la enfermedad que portar el alelo A (OR= 2,33; *p*= 0,037). Aunque solo se obtiene evidencia estadística en la comparación GG vs. AG (OR= 2,40; *p*= 0,042), se obtiene un *Odds Ratio* similar (2,20) en el caso de la comparación GG vs. AA.

La edad y el tabaquismo son factores que pueden provocar un daño genotóxico, generando roturas en el ADN que, de no ser reparadas, pueden transmitirse a las células hijas y favorecer la proliferación tumoral. Ante un estrés celular causado por estos factores, la proteína p21 puede ser activada por el p53 para llevar a cabo la detención del ciclo celular, proporcionando tiempo suficiente para llevar a cabo la reparación de errores en el ADN. Variaciones polimórficas en el gen que codifica para el inhibidor p21 pueden desembocar en una eficacia diferencial para llevar a cabo la detención del ciclo celular o la apoptosis.

De acuerdo con lo descrito en carcinoma de esófago (Guo *et al*., 2019), los individuos portadores del genotipo GG del rs2395655 podrían asociarse con una mayor expresión de la proteína p21, pero también, con el potenciamiento de sus actividades anti-apoptóticas por una mayor unión con el factor oncogénico LEDFG/75. Teniendo en cuenta que en el cáncer de próstata un aumento en la expresión del p21 se ha asociado con la resistencia a la apoptosis (Martínez *et al*., 2002) y, por lo tanto, con una supervivencia reducida y la progresión hacia un cáncer andrógeno-independiente (Fizazi *et al*., 2002), personas portadoras del genotipo GG y

sometidas a un estrés genotóxico causado por la edad o el tabaquismo podrían tener una menor capacidad de eliminación de células dañadas, favoreciendo la carcinogénesis de próstata.

En referencia al índice de masa corporal, no se ha encontrado relación estadísticamente significativa, aunque el impacto del genotipo GG en relación al AG parece ponerse más de manifiesto en los individuos con un IMC mayor o igual a 31 (OR= 2,11).

Tabla 90. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	AA	37	17	GG vs. AA	0,68	0,31-1,52	0,354
<67	AG	71	35	GG vs. AG	0,74	0,38-1,45	0,380
	GG	33	22	GG vs. AA+AG	0,72	0,38-1,36	0,313
	AA	26	30	GG vs. AA	1,70	0,75-3,82	0,199
≥67	AG	53	73	GG vs. AG	2,03	1,00-4,10	**0,049**
	GG	25	17	GG vs. AA+AG	1,92	0,97-3,77	0,059
Tabaquismo (PY)							
	AA	21	15	GG vs. AA	0,66	0,24-1,82	0,422
No fumadores	AG	40	31	GG vs. AG	0,72	0,30-1,76	0,467
	GG	13	14	GG vs. AA+AG	0,70	0,30-1,63	0,408
	AA	39	32	GG vs. AA	1,48	0,75-2,91	0,258
Fumadores	AG	84	75	GG vs. AG	1,61	0,90-2,87	0,107
	GG	45	25	GG vs. AA+AG	1,57	0,90-2,72	0,111
	AA	24	14	GG vs. AA	0,97	0,37-2,51	0,948
>0-<36	AG	55	37	GG vs. AG	1,19	0,53-2,65	0,669
	GG	23	13	GG vs. AA+AG	1,14	0,53-2,46	0,734
	AA	15	18	GG vs. AA	2,20	0,82-5,88	0,113
≥36	AG	29	38	GG vs. AG	2,40	1,03-5,61	**0,042**
	GG	22	12	GG vs. AA+AG	2,33	1,05-5,19	**0,037**
IMC							
	AA	44	26	GG vs. AA	1,18	0,58-2,40	0,642
<31	AG	97	54	GG vs. AG	1,11	0,60-2,05	0,730
	GG	44	22	GG vs. AA+AG	1,14	0,63-2,03	0,669
	AA	14	11	GG vs. AA	1,44	0,40-5,20	0,573
≥31	AG	20	23	GG vs. AG	2,11	0,66-6,73	0,204
	GG	11	6	GG vs. AA+AG	1,83	0,61-5,51	0,277

En la Tabla 91 se muestra la asociación del polimorfismo con la enfermedad valorando la interacción entre los tres factores de estudio.

Aunque lo datos brutos, si acaso, sugieren que la ausencia del alelo A conlleva a un riesgo ligeramente superior a desencadenar carcinogénesis de próstata, el efecto diferencial de las variantes parece estar eclipsada, ya que en los análisis de estratificación es en donde se manifiesta de manera más clara tal efecto (Tabla 90). Aún más, no es sino en los análisis de la interacción conjunta de variables donde el impacto de estos genotipos sale más claramente a la luz (Tabla 91).

De este modo, los análisis de estratificación de variables combinadas desvelan el impacto que tiene la edad en combinación, bien sea con el tabaquismo o con la obesidad. Los resultados más significativos se revelan en los sujetos con una edad igual o superior a 67 años y con presencia de obesidad (IMC ≥31). Los individuos con estas características y que, además, portan dos copias del alelo G manifiestan un incremento en el riesgo de padecer PCa hasta 9 veces superior que el de aquellos con la variante alélica A (OR= 9,23; *p*= 0,026). La susceptibilidad asociada al genotipo GG se acentúa especialmente en comparación con los individuos heterocigotos (OR=15,00; *p*= 0,008). Estos resultados son especialmente relevantes si tenemos en cuenta que un amplio sector de la población occidental con una edad comprendida en este estrato presenta valores de IMC que indican obesidad.

En menor medida, los individuos con el genotipo GG sometidos a un estrés tabáquico inherente a consumos superiores a 36 *pack-years* y que pertenecen a este estrato de edad (≥67 años) presentan un riesgo que puede ser hasta 4 veces superior que el de portadores del alelo A ($OR_{GG/AA}$= 4,20; *p*= 0,048; $OR_{GG/AA+AG}$= 3,51; *p*= 0,037).

Por el contrario, en la valoración conjunta del IMC y el tabaquismo, el efecto de riesgo de los genotipos GG pasa mucho más desapercibido, no obteniendose resultados estadísticamente significativos, tal y como lo reflejan los datos referidos en la Tabla 91.

En definitiva, los resultados parecen apuntar a que el efecto diferencial de las variantes genotípicas del rs2395655 se manifiesta de manera más clara dependiendo de las condiciones del entorno celular. En ese sentido, la edad es un factor clave en tanto que el máximo impacto se obtiene al valorar la interacción de esta variable con el tabaquismo o la obesidad. El progresivo avance de la edad conlleva a un deterioro paulatino en la capacidad que tiene la célula de mantener la integridad del genoma y la homeostasis celular. La edad, es por lo tanto, un detonante como consecuencia de la progresiva incapacidad de la célula de reparar los daños causados por factores estresantes como los carcinógenos del tabaco o las adipokinas proinflamatorias inherentes a la obesidad. En este ambiente celular, el efecto anti-apoptótico y pro-oncogénico del genotipo GG permitiría la proliferación de células dañadas y, como tal, incrementaría la probabilidad de desarrollo tumoral.

Tabla 91. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
EDAD ≥67 & PY >0	AA	15	20	GG vs. AA	2,53	0,92-6,99	0,071
	AG	34	49	GG vs. AG	2,74	1,15-6,54	**0,023**
	GG	19	10	GG vs. AA+AG	2,68	1,16-6,16	**0,020**
EDAD ≥67 & PY ≥36	AA	6	14	GG vs. AA	4,20	0,99-17,74	**0,048**
	AG	14	25	GG vs. AG	3,21	0,91-11,29	0,066
	GG	9	5	GG vs. AA+AG	3,51	1,07-11,49	**0,037**
EDAD ≥67 & IMC ≥31	AA	7	5	GG vs. AA	4,29	0,40-45,67	0,216
	AG	6	15	GG vs. AG	15,00	1,94-115,70	**0,008**
	GG	6	1	GG vs. AA+AG	9,23	1,28-66,80	**0,026**
IMC ≥31 & PY >0	AA	9	10	GG vs. AA	2,00	0,48-8,36	0,335
	AG	15	19	GG vs. AG	2,28	0,63-8,24	0,204
	GG	9	5	GG vs. AA+AG	2,18	0,65-7,32	0,206
IMC ≥31 & PY ≥36	AA	5	6	GG vs. AA	1,60	0,23-11,37	0,629
	AG	7	10	GG vs. AG	1,90	0,31-11,62	0,476
	GG	4	3	GG vs. AA+AG	1,78	0,33-9,60	0,497

5.9. *CDKN1B*.

5.9.1. rs34330 (*CDKN1B*).

La distribución de genotipos y alelos correspondientes a este polimorfismo se detalla en la Tabla 92. Las frecuencias genotípicas encontradas en el grupo de individuos control no difieren de lo esperado en una situación de equilibrio *Hardy-Weinberg* (χ^2= 8,548; *p*= 0,004) tras la aplicación de la corrección de *Bonferroni-Sidak* para comparaciones múltiples que disminuye el nivel de significación hasta 0,003. El alelo minoritario es el T, con una frecuencia similar en ambos grupos poblacionales (0,289 en casos y 0,296 en controles). Esta proporción está en concordancia con lo encontrado en otras poblaciones europeas (0,210-0,310) (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas de casos y controles (t_s= 0,238; *p*= 0,812).

Tabla 92. Distribución genotípica y alélica del rs34330 (*CDKN1B*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
CC	146 (50,52)	113 (45,75)	C	0,711 ± 0,019	0,704 ± 0,021
CT	119 (41,18)	122 (49,39)	T	0,289 ± 0,019	0,296 ± 0,021
TT	24 (8,30)	12 (4,86)			
$\hat{h}$				0,412 ± 0,023	0,418 ± 0,024
Eq. H-W x^2 (*p*)	8,548 (0,004)				
Estadístico t_s (*p*)				0,238 (0,812)	

Al valorar la influencia del rs34330 en el desarrollo del cáncer de próstata a nivel global (Tabla 93) se obtienen resultados de alto impacto, siendo los modelos codominante y recesivo los más informativos. La susceptibilidad a esta enfermedad parece ser máxima para los individuos con el alelo T en homocigosis, encontrandose un 77% más de riesgo que para aquellos con el alelo C, tanto en homocigosis como en heterocigosis. Parece observarse un riesgo diferencial para los genotipos, encontrandose una predisposición a la enfermedad hasta dos veces superior para las personas con el genotipo TT en comparación con aquellas con el heterocigoto CT, con resultados muy cercanos a la evidencia estadística (OR= 2,05; *p*= 0,053)

Por lo tanto, los resultados derivados del análisis sin estratificar desvelan una influencia relativamente elevada del rs34330 en el inicio de la carcinogénesis de próstata, encontrándose un efecto protector para los individuos que llevan en el genoma el alelo C. En otras palabras, el genotipo TT es el que presenta el mayor efecto de riesgo frente a esta enfermedad. Debido al bajo grado de polimorfismo del marcador, el genotipo TT presenta frecuencias bajas en esta población, lo cual puede condicionar que los resultados no alcancen la significación estadística.

Este es el primer estudio que analiza la asociación del rs34330 con el cáncer de próstata a nivel mundial. No obstante, los resultados encontrados son totalmente coincidentes con lo descrito en el resto de estudios publicados en otros cánceres, tales como neuroblastoma (Capasso *et al*., 2017), carcinoma endometrial (Cai *et al*., 2011), pulmonar (Wang *et al*., 2007), hepatocelular (Liu *et al*., 2013), mamario (Driver *et al*., 2008; Ma *et al*., 2006) o tiroideo (Landa

et al., 2010), donde el alelo T se presenta como un factor de riesgo, especialmente en homocigosis.

El genotipo TT de este polimorfismo se ha vinculado con una disminución en la actividad transcripcional del gen *CDKN1B* debido a una menor afinidad de unión por los factores de transcripción AP-2a y Sp1, asociándose con niveles de ARNm y proteína p27 bajos (Capasso *et al*., 2017; Landa *et al*., 2010; Lee & Shatkay, 2007). Teniendo en cuenta que la proteína p27 ejerce una función supresora tumoral en el cáncer de próstata (Han *et al*., 2015), una menor expresión de esta proteína podría predisponer a las personas portadoras de esta variante genotípica al inicio de la enfermedad.

Tabla 93. Asociación del rs34330 (*CDKN1B*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
TT vs. CC	1,55	0,74-3,22	0,241	1,48	0,70-3,11	0,302
TT vs. CT	2,05	0,99-4,25	0,053	1,99	0,94-4,20	0,071
CC vs. CT	1,32	0,93-1,88	0,117	1,35	0,94-1,93	0,101
Dominante						
TT+CT vs. CC	0,83	0,59-1,16	0,271	0,81	0,57-1,14	0,227
Recesivo						
TT vs. CC+CT	1,77	0,87-3,60	0,112	1,70	0,83-3,51	0,149
Sobredominante						
TT+CC vs. CT	1,39	0,99-1,96	0,057	1,41	1,00-2,00	0,052
Alélico						
T vs. C	0,97	0,74-1,26	0,812	0,95	0,71-1,25	0,690

[a]Análisis ajustado por edad.

La asociación del rs34330 con el cáncer de próstata estratificando en función de las tres variables de estudio se muestra en la Tabla 94.

Cuando se analiza la variable edad, el impacto del genotipo TT parece ser mayor en los varones con una edad inferior a los 65 años. No obstante, no se desvela una asociación estadísticamente significativa con este factor.

No es, sino, al examinar la interacción del marcador con el tabaquismo o el IMC en donde se pone más de manifiesto el efecto diferencial de las variantes, encontrado resultados estadísticamente significativos.

Los carcinógenos del tabaco parecen ser un detonante a la hora de detectar el efecto funcional de los genotipos de este marcador en el inicio del cáncer de próstata, ya que donde se observa más claramente el impacto es en los sujetos consumidores de una cantidad alta de tabaco (≥31 *pack-years*). Así, en los varones sometidos a un estrés genotóxico ocasionado por el tabaquismo, portar el genotipo TT implica un riesgo casi cuatro veces superior de padecer la enfermedad en comparación con llevar en el genoma el alelo C (OR= 3,62; *p*= 0,042).

Apoyando nuestros resultados, se ha visto que los individuos con el genotipo TT presentan un aumento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón especialmente cuando son consumidores de un número mayor o igual a 37,5 *pack-years* (OR= 6,24) (Wang *et al*., 2007).

El alto consumo de tabaco puede aumentar la probabilidad de sufrir mutaciones en el ADN debido al estrés oxidativo y la formación de aductos. Puesto que la proteína p27 actúa como supresora tumoral, frenando el avance de células con daños genómicos, una disminución de sus niveles podría impedir la detención del ciclo celular y favorecer la transmisión de mutaciones a las células hijas. Esto desembocaría en una proliferación incontrolada de células con daños genómicos, permitiendo la instauración de un cáncer. En un ambiente de estrés celular ocasionado por el tabaquismo, se entiende que los individuos carentes del alelo C, el cual se ha vinculado con una mayor expresión génica de p27, sean los que manifiesten una mayor predisposición al carcinoma de próstata.

En cuanto al IMC, los resultados también desvelan un aumento significativo en el riesgo de PCa para los sujetos portadores del alelo T en homocigosis cuando presentan sobrepeso u obesidad (IMC $\geq$25). Los varones con estas características que llevan el genotipo TT manifiestan hasta 3 veces más predisposición a la enfermedad que aquellos con un IMC similar pero que son portadores de los genotipos CC o CT (OR= 3,44; *p*= 0,021).

La obesidad influencia la proliferación celular y el crecimiento a través de la vía de señalización PI3K/Akt1, la cual a su vez inhibe la transcripción del p27 y promueve su degradación (Ogino *et al*., 2009). De este modo, es posible que los individuos obesos portadores del genotipo TT presenten niveles de proteína p27 en la célula sumamente bajos, haciendo imposible la detención del ciclo celular y desembocando en el inicio de un carcinoma.

Tabla 94. Asociación del rs34330 con el PCa (*CDKN1B*) estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
Edad (años)							
	CC	64	49	TT vs. CC	2,11	0,64-6,90	0,217
<65	CT	56	56	TT vs. CT	2,75	0,85-8,87	0,089
	TT	11	4	TT vs. CC+CT	2,41	0,77-7,56	0,132
	CC	79	63	TT vs. CC	1,20	0,46-3,11	0,713
≥65	CT	59	64	TT vs. CT	1,63	0,62-4,25	0,318
	TT	12	8	TT vs. CC+CT	1,38	0,55-3,48	0,494
Tabaquismo (PY)							
	CC	41	34	TT vs. CC	1,49	0,46-4,89	0,505
No fumadores	CT	37	36	TT vs. CT	1,75	0,54-5,72	0,350
	TT	9	5	TT vs. CC+CT	1,62	0,52-5,03	0,406
	CC	103	78	TT vs. CC	1,52	0,59-3,92	0,391
Fumadores	CT	77	82	TT vs. CT	2,13	0,83-5,48	0,116
	TT	14	7	TT vs. CC+CT	1,78	0,71-4,47	0,221
	CC	99	69	TT vs. CC	0,93	0,37-2,33	0,875
<31	CT	74	77	TT vs. CT	1,39	0,55-3,49	0,485
	TT	12	9	TT vs. CC+CT	1,13	0,46-2,75	0,795
	CC	45	43	TT vs. CC	3,50	0,97-12,71	0,055
≥31	CT	40	41	TT vs. CT	3,76	1,03-13,65	**0,043**
	TT	11	3	TT vs. CC+CT	3,62	1,05-12,56	**0,042**
IMC							
	CC	22	13	TT vs. CC	1,18	0,19-7,53	0,858
<25	CT	15	15	TT vs. CT	2,00	0,32-12,67	0,455
	TT	4	2	TT vs. CC+CT	1,51	0,26-8,88	0,644
	CC	105	78	TT vs. CC	3,16	1,07-9,32	**0,037**
≥25	CT	90	80	TT vs. CT	3,78	1,30-11,02	**0,015**
	TT	17	4	TT vs. CC+CT	3,44	1,20-9,85	**0,021**

La asociación del rs34330 con el cáncer de próstata en función de la interacción entre las variables de estudio se muestra en la Tabla 95.

El efecto del marcador en el inicio del cáncer de próstata se ve más claramente en los hombres que presentan sobrepeso u obesidad cuando, además, son jóvenes (<65 años), obteniendose resultados estadísticamente significativos. El riesgo del genotipo TT se dispara cuando se valoran estos dos factores conjuntamente, obteniendo una predisposición más de 6 veces superior que la correspondiente a los individuos con el alelo C, especialmente en heterocigosis.

Tabla 95. Asociación del rs34330 (*CDKN1B*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
EDAD <65 & IMC ≥25	CC	50	34	TT vs. CC	5,44	0,79-37,53	0,084
	CT	44	41	TT vs. CT	7,45	1,16-47,80	**0,033**
	TT	8	1	TT vs. CC+CT	6,38	1,00-40,72	**0,049**
EDAD <65 & PY ≥31	CC	21	16	TT vs. CC	3,09	0,34-28,32	0,312
	CT	22	16	TT vs. CT	2,96	0,32-27,20	0,333
	TT	23	0	TT vs. CC+CT	3,02	0,35-26,00	0,311
IMC ≥25 & PY ≥31	CC	31	28	TT vs. CC	3,61	0,75-17,29	0,105
	CT	34	29	TT vs. CT	3,41	0,71-16,33	0,122
	TT	8	2	TT vs. CC+CT	3,51	0,77-15,90	0,102

5.9.2. rs2066827 (*CDKN1B*).

Para este marcador, el alelo minoritario es el G, con una frecuencia superior en casos (0,304) que en controles (0,282), aunque las diferencias encontradas entre ambos subgrupos no son estadísticamente significativas (t_s= 0,818; *p*= 0,413) (Tabla 96). La frecuencia del alelo G en nuestra población es un poco superior a la descrita en otras poblaciones de origen europeo, con valores que fluctúan entre 0,230 y 0,260 (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2015*). No existen evidencias en contra de que la población de controles se encuentre en equilibrio genético para este marcador (χ^2= 0,589; *p*= 0,450).

Tabla 96. Distribución genotípica y alélica del rs2066827 (*CDKN1B*) en la muestra de estudio.

Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	Alelos	Casos Frec. ± s.e.	Controles Frec. ± s.e.
TT	146 (50,52)	124 (50,61)	T	0,696 ± 0,019	0,718 ± 0,020
GT	110 (38,06)	104 (42,45)	G	0,304 ± 0,019	0,282 ± 0,020
GG	33 (11,42)	17 (6,94)			
$\hat{h}$				0,425 ± 0,021	0,406 ± 0,025
Eq. H-W x^2 (*p*)	0,589 (0,450)				
Estadístico t_s (*p*)				0,818 (0,413)	

El análisis de la influencia del rs2066827 en el cáncer de próstata se resume en la Tabla 97. Se encuentran valores de alto impacto en los modelos codominante y recesivo, con resultados cercanos a la evidencia estadística. El alelo G muestra un efecto de riesgo en homocigosis, mientras que el alelo T ejerce un efecto protector. De este modo, los individuos con el genotipo GG presentan un 73% más de riesgo frente al desarrollo de PCa que aquellos con la variante alélica T, tanto en homocigosis como en heterocigosis, aunque el efecto parece ser más acentuado en la comparación con el genotipo GT (OR= 1,84).

Los estudios realizados en cáncer de próstata para otras poblaciones parecen apuntar en una dirección opuesta a lo descrito en este trabajo, ya que el genotipo GG se ha vinculado con un descenso en la predisposición a la enfermedad en población china (Han *et al*., 2015) o a la enfermedad de tipo avanzada en población Caucasoide Americana (Kibel *et al*., 2003).

Se han publicado otros dos trabajos relacionando este marcador con el PCa, en población taiwanesa (Huang *et al*., 2008) o de etnia *Han Chinese* (Zhang *et al*., 2018), pero no se ha desvelado una asociación significativa con la enfermedad debido a que la frecuencia del alelo G en ambos grupos poblaciones es especialmente baja (0,021 y 0,046, respectivamente), de modo que no se encuentra ningún individuo portador del genotipo GG. Las diferencias entre las frecuencias poblacionales podrían explicar, en parte, los resultados diversos encontrados en relación a este polimorfismo.

Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo descrito en cáncer de pulmón (Zilani *et al*., 2018), de cabeza y cuello (Li *et al*., 2004) o de ovario (Mohamed *et al*., 2013), desvelando un efecto de riesgo para el alelo G, especialmente en homocigosis.

Partimos de la base de que el rs2066827 implica el cambio del aminoácido valina (G**T**C) por glicina (G**G**C) en una zona de la proteína p27 que afecta a la fosforilación por parte de la proteína $p38^{JAB1}$, cuyo proceso favorece su translocación al citoplasma y degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma (Tomoda *et al*., 1999). Es posible que la configuración proteica de p27 asociada con el genotipo GG (GlyGly) favorezca una mayor afinidad de unión con la proteína $p38^{JAB1}$. Esto permitiría una mayor fosforilación de la proteína p27 así como un aumento en la tasa de translocación citoplasmática. La localización subcelular de esta proteína se asocia con la pérdida de su función inhibitoria del ciclo celular y la adquisición de propiedades oncogénicas, como la resistencia a la apoptosis. Por consiguiente, las personas con el genotipo GG presentarían una mayor probabilidad de proliferación de células potencialmente cancerígenas, incrementando el riesgo de desarrollar un carcinoma.

Tabla 97. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa según diferentes modelos genéticos.

Modelo genético	OR	IC 95%	*p*	OR[a]	IC 95%[a]	*p*[a]
Codominante						
GG vs. TT	1,65	0,88-3,09	0,119	1,62	0,85-3,07	0,143
GG vs. GT	1,84	0,97-3,48	0,062	1,82	0,95-3,48	0,071
TT vs. GT	1,11	0,78-1,60	0,559	1,13	0,78-1,62	0,525
Dominante						
GG+GT vs. TT	1,00	0,71-1,41	0,983	0,99	0,70-1,40	0,941
Recesivo						
GG vs. GT+TT	1,73	0,94-3,17	0,077	1,71	0,92-3,17	0,089
Sobredominante						
GG+TT vs. GT	1,20	0,85-1,70	0,303	1,22	0,86-1,74	0,272
Alélico						
G vs. T	1,12	0,86-1,46	0,414	1,10	0,84-1,43	0,480

[a]Análisis ajustado por edad.

Los intervalos de mayor impacto en la asociación del rs2066827 con el cáncer de próstata estratificando la muestra en función de las tres variables de estudio se muestran en la Tabla 98.

Aunque en el análisis general de la muestra los datos ya apuntaban a un efecto de riesgo para el genotipo GG frente al cáncer de próstata, al valorar la interacción con la edad es donde el impacto de este polimorfismo se manifiesta más claramente, obteniendo resultados estadísticamente significativos. De este modo, los individuos jóvenes con una edad inferior a los 57 años de edad y portadores de este genotipo presentan un riesgo 7 veces superior de desarrollar PCa en comparación con aquellos con el alelo T (OR= 7,64; p= 0,039), y 9 veces mayor que los heterocigotos GT (OR= 9,33; *p*= 0,031).

Cuando se analiza la evolución de la susceptibilidad al PCa a medida que se incrementa la edad de los individuos (Fig. 81), se descubre un impacto mayor para el genotipo GG en los individuos jóvenes (<57, <58, <59). Parece tratarse, por lo tanto, de un marcador de inicio precoz, ya que la susceptibilidad al cáncer de próstata para los varones carentes del alelo T desciende progresivamente a medida que se produce el envejecimiento.

De este modo, mientras que en los individuos con una edad inferior a los 57 años portar el alelo G en homocigosis implica un riesgo 7 veces mayor que llevar el alelo T ($OR_{GG/GT+TT}$= 7,64; *p*= 0,031), en aquellos con una edad inferior a los 60 años esta predisposición desciende hasta ser solo 4 veces más ($OR_{GG/GT+TT}$= 4,42, *p*= 0,047).

A partir de los 62 años de edad, y hasta los 70, el impacto del genotipo GG en función de los otros dos genotipos se mantiene más o menos estable. Así, por ejemplo, los hombres que llevan esta variante genotípica y presentan una edad inferior a los 70 años manifiestan un aumento en el riesgo de PCa solo 2 veces superior que el de aquellos con la variante alélica T ($OR_{GG/GT+TT}$= 2,95; *p*= 0,011). Para los individuos de mayor edad los resultados se acercan a la neutralidad y se pierde la significación estadística.

En los individuos jóvenes el proceso de translocación citoplasmática de la proteína p27 y la consiguiente adquisición de propiedades oncogénicas asociadas al genotipo GG podría acelerarse desembocando en una predisposición al cáncer de próstata mucho más acusada que en edades más tardías. Es decir, el efecto diferencial de las variantes de este marcador se ve más claramente en los varones relativamente jóvenes porque a medida que avanza la edad los fenómenos asociados al envejecimiento podrían enmascarar dicha predisposición genética.

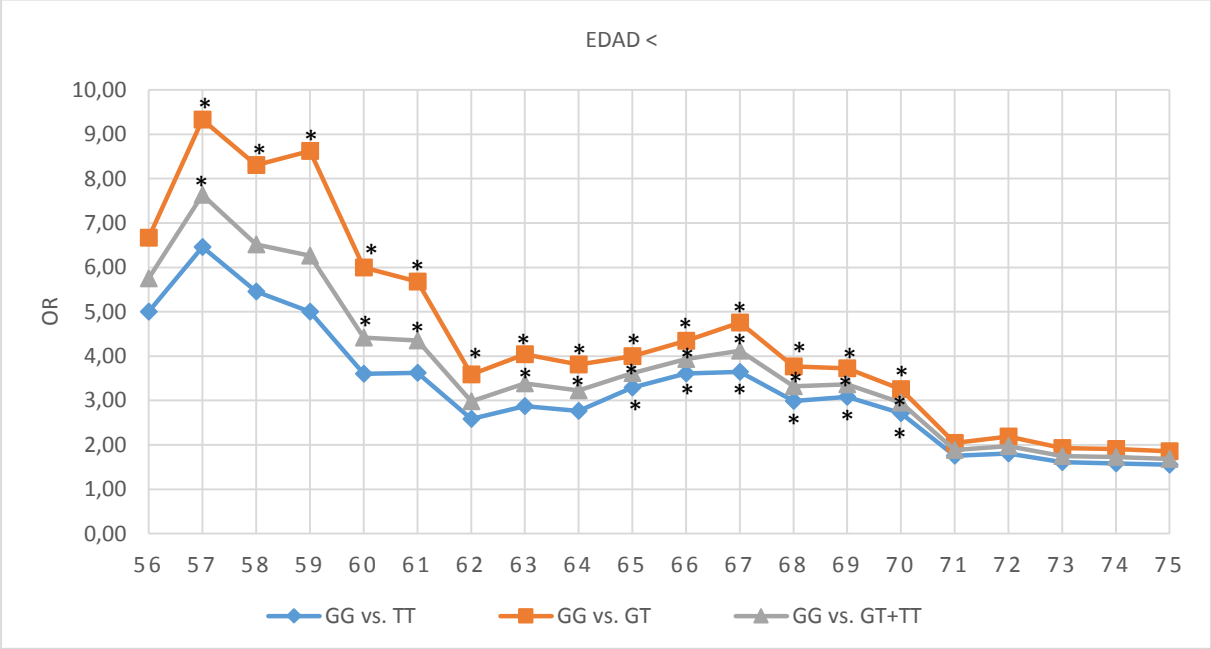

Figura 81. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*CDKN1B*-rs2066827). *Valores estadísticamente significativos usando un test x^2 ($p<0,05$).

No se observa una gran interrelación del tabaquismo con la variabilidad genética de este marcador en el desarrollo del PCa, ya que el mayor efecto diferencial de las variantes se presenta en los individuos no fumadores o consumidores de una cantidad de tabaco inferior a los 30 *pack-years*.

En referencia al índice de masa corporal, el impacto del polimorfismo parece ser mayor en los individuos con sobrepeso (25-29,99), concretamente en aquellos con presencia de sobrepeso de grado I (25-26,99). Los sujetos que pertenecen a esta categoría y llevan en el genoma el genotipo GG muestran un aumento en la predisposición al PCa 5 veces superior que los heterocigotos GT (OR= 5,00; *p*= 0,046) y 4 veces mayor que los que portan el alelo T (OR= 4,22), aunque en este último caso no se obtiene suficiente evidencia estadística.

El sobrepeso es un factor de estrés del medio celular que puede favorecer la adquisición de mutaciones en el genoma. Personas con el genotipo GG que presentan sobrepeso pueden relacionarse con una menor capacidad de detención de células con el genoma dañado así como con una mayor resistencia a la apoptosis debido a la localización citoplasmática de la proteína p27, lo cual incrementaría su predisposición a desarrollar cáncer de próstata.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 98. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa estratificando por variables.

	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
Edad (años)							
	TT	13	14	GG vs. TT	6,46	0,81-51,77	0,074
<57	GT	9	14	GG vs. GT	9,33	1,19-73,45	**0,031**
	GG	6	1	GG vs. GT+TT	7,64	1,09-53,36	**0,039**
	TT	129	109	GG vs. TT	1,37	0,70-2,69	0,354
≥57	GT	98	88	GG vs. GT	1,46	0,74-2,90	0,279
	GG	26	16	GG vs. GT+TT	1,41	0,74-2,70	0,299
Tabaquismo (PY)							
	TT	44	33	GG vs. TT	2,25	0,58-8,80	0,241
No fumadores	GT	34	39	GG vs. GT	3,44	0,91-13,08	0,068
	GG	9	3	GG vs. GT+TT	2,77	0,75-10,19	0,124
	TT	98	89	GG vs. TT	1,49	0,72-3,07	0,277
Fumadores	GT	73	62	GG vs. GT	1,40	0,66-2,94	0,380
	GG	23	14	GG vs. GT+TT	1,45	0,72-2,91	0,295
	TT	89	66	GG vs. TT	1,57	0,67-3,67	0,301
<30	GT	66	75	GG vs. GT	2,40	1,03-5,59	**0,042**
	GG	19	9	GG vs. GT+TT	1,92	0,85-4,34	0,116
	TT	53	56	GG vs. TT	1,72	0,66-4,46	0,265
≥30	GT	41	26	GG vs. GT	1,03	0,37-2,84	0,953
	GG	13	8	GG vs. GT+TT	1,42	0,56-3,59	0,460
IMC							
	TT	20	16	GG vs. TT	1,07	0,20-5,58	0,938
<25	GT	17	11	GG vs. GT	0,86	0,16-4,73	0,863
	GG	4	3	GG vs. GT+TT	0,97	0,20-4,76	0,973
	TT	21	19	GG vs. TT	3,62	0,72-18,21	0,115
25-26,99	GT	16	20	GG vs. GT	5,00	1,00-24,81	**0,046**
	GG	8	2	GG vs. GT+TT	4,22	0,92-19,32	0,062
	TT	48	29	GG vs. TT	2,42	0,50-11,80	0,273
27-29,99	GT	37	19	GG vs. GT	2,05	0,40-10,51	0,384
	GG	8	2	GG vs. GT+TT	2,26	0,48-10,72	0,303
	TT	34	38	GG vs. TT	1,68	0,54-5,20	0,368
≥30	GT	31	26	GG vs. GT	1,26	0,39-4,03	0,697
	GG	9	6	GG vs. GT+TT	1,48	0,50-4,38	0,481

En la Tabla 99 se presenta la relación del rs2066827 con el PCa valorando la interacción entre los tres factores de estudio. Los valores de OR que se obtienen en este análisis son inferiores que al examinar de forma individual la edad (<57 años) o el IMC (25-26,99), no desvelándose asociación estadística, por lo que se puede concluir que, en este marcador, la variable tabaquismo no presenta una gran interacción con los otros dos factores estudiados.

Tabla 99. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.

Variables combinadas	Genotipos	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*P*
EDAD <57 &	TT	9	12	GG vs. TT	6,67	0,76-58,11	0,080
PY <30	GT	7	10	GG vs. GT	7,14	0,78-65,57	0,076
	GG	5	1	GG vs. GT+TT	6,88	0,90-52,57	0,060
IMC 25-26,99 &	TT	13	14	GG vs. TT	3,77	0,69-20,68	0,121
PY <30	GT	11	12	GG vs. GT	3,82	0,67-21,70	0,125
	GG	7	2	GG vs. GT+TT	3,79	0,77-18,78	0,100

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.9.3. rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*).

Los marcadores rs34330 y rs2066827 se encuentran situados en el gen *CDKN1B*, por lo que se han realizado análisis para valorar el desequilibrio de ligamiento entre ellos. Se obtienen valores muy bajos, tanto del coeficiente de *Lewontin* (D´= 0,372) como del coeficiente de correlación (r^2= 0,023). Estos resultados nos indican que no existe desequilibrio de ligamiento entre ambos polimorfismos sino que parecen segregar de manera independiente (Fig. 82). La existencia de recombinación genética entre ambos SNPs permite que en la muestra poblacional aparezcan representados los cuatro haplotipos posibles formados por la combinación de alelos de ambos marcadores (Tabla 100).

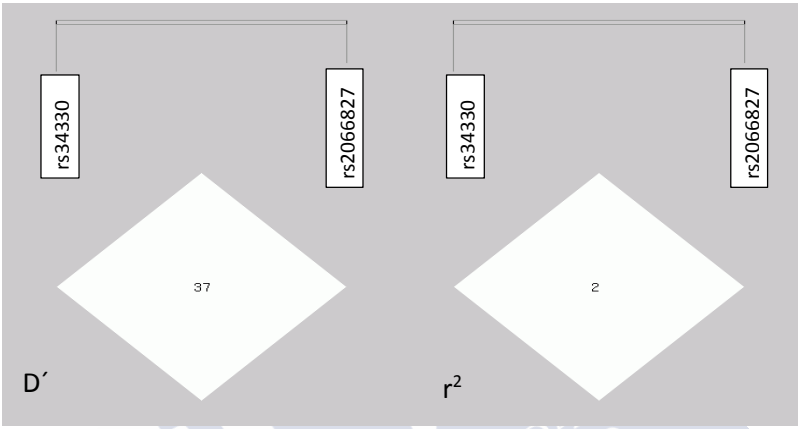

Figura 82. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs34330 y rs2066827 del *locus CDKN1B*.

La distribución de frecuencias correspondientes a los haplotipos formados por estos dos marcadores en nuestra muestra poblacional se expone en la Tabla 100.

En el análisis de asociación con el cáncer de próstata se desvelan resultados estadísticamente significativos, encontrandose un riesgo absoluto para el haplotipo T-G (Tabla 100). De este modo, los individuos portadores del alelo T en el rs34330 y del G en el rs2066827 tendrán un 65% más de riesgo de desarrollar PCa con respecto de los sujetos que lleven en el genoma cualquiera de las otras combinaciones (OR= 1,65; *p*= 0,045). El riesgo para los varones con el haplotipo T-G se dispara hasta ser casi 3 veces mayor que el de aquellos con el resto de haplotipos (OR= 2,89; *p*= 0,003) cuando, además, presentan sobrepeso u obesidad (IMC ≥25).

Los alelos T (rs34330) y G (rs2066827) presentan un comportamiento de riesgo en el análisis individual de los polimorfismos, por lo que parece haber una cooperación entre ambos a la hora de favorecer el establecimiento del cáncer de próstata. La mayor susceptibilidad para los individuos con estas variantes alélicas podría explicarse por medio de dos mecanismos: una menor capacidad supresora tumoral de la proteína p27 en el núcleo de la célula, debido a la disminución de su expresión génica vinculada al alelo T, y la adquisición de propiedades oncogénicas asociadas al alelo G por una mayor exportación de la proteína p27 al citoplasma.

Tabla 100. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*) y asociación con el PCa.

Haplotipo[a]	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
C-T	0,490	0,475	C-T vs. C-G	1,07	0,79-1,46	0,658
			C-T vs. T-T	1,22	0,90-1,67	0,196
C-G	0,221	0,229	C-T vs. T-G	0,65	0,39-1,07	0,091
T-T	0,205	0,244	C-T vs. -	1,06	0,84-1,35	0,616
T-G	0,084	0,052				
			C-G vs. C-T	0,93	0,69-1,27	0,658
			C-G vs. T-T	1,14	0,80-1,64	0,466
			C-G vs. T-G	0,60	0,35-1,03	0,066
			C-G vs. -	0,95	0,71-1,27	0,743
			T-T vs. C-T	0,82	0,60-1,11	0,196
			T-T vs. C-G	0,88	0,61-1,25	0,466
			T-T vs. T-G	0,53	0,31-0,90	**0,020**
			T-T vs. -	0,80	0,60-1,07	0,134
			T-G vs. C-T	1,55	0,93-2,57	0,091
			T-G vs. C-G	1,66	0,97-2,85	0,066
			T-G vs. T-T	1,90	1,11-3,25	**0,020**
			T-G vs. -	1,65	1,01-2,70	**0,045**

[a]Orden de haplotipo: rs34330C>T-rs2066827T>G.

En la Tabla 101 se muestra la distribución de frecuencias correspondientes a las combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs34330 y rs2066827.

Se desvela un efecto protector frente al desarrollo de PCa para los individuos portadores del genotipo CT en el rs34330 y del TT en el rs2066827, en comparación con aquellos que llevan en el genoma cualquiera de las otras combinaciones genotípicas (OR= 0,58; *p*= 0,007). Estos resultados son coherentes con los descritos en el análisis individual de los marcadores, ya que tanto el genotipo CT como el TT manifiestan un efecto protector frente al inicio de la enfermedad.

En concreto, los resultados llevados a cabo en nuestra muestra poblacional desvelan una susceptibilidad máxima al PCa para los individuos portadores de la combinación genotípica TT-TT en comparación con aquellos que son CT-TT, con un riesgo más de 3 veces superior (OR= 3,56; *p*= 0,015).

Del mismo modo, también se encuentra una predisposición genética elevada para los individuos con la combinación genotípica CT-GG en comparación con los sujetos CT-TT (OR= 3,31; *p*= 0,024). La diferencia en la susceptibilidad de los individuos con estas combinaciones genotípicas al PCa se incrementa hasta 5 veces cuando presentan un IMC igual o superior a 25 (OR= 5,26; *p*= 0,026).

Tabla 101. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*) y asociación con el PCa.

Combinación genotípica[a]	Casos (%)	Controles (%)	Modelo	OR	IC 95%	*P*
CC-TT	73 (25,26)	44 (17,96)	CC-TT vs. CC-GT	1,69	1,00-2,85	**0,050**
CC-GT	56 (19,38)	57 (23,27)	CC-TT vs. CT-TT	2,11	1,27-3,49	**0,004**
CC-GG	17 (5,88)	11 (4,49)	CC-TT vs. -	1,55	1,02-2,35	**0,042**
CT-TT	59 (20,42)	75 (30,61)	CC-GT vs. CC-TT	0,59	0,35-1,00	**0,050**
CT-GT	47 (16,26)	41 (16,73)				
CT-GG	13 (4,50)	5 (2,04)	CT-TT vs. CC-TT	0,47	0,29-0,79	**0,004**
TT-TT	14 (4,84)	5 (2,04)	CT-TT vs. CT-GG	0,30	0,11-0,86	**0,024**
TT-GT	7 (2,42)	6 (2,45)	CT-TT vs. TT-TT	0,28	0,10-0,79	**0,015**
TT-GG	3 (1,04	1 (0,41)	CT-TT vs. -	0,58	0,39-0,86	**0,007**
			CT-GG vs. CT-TT	3,31	1,16-9,40	**0,024**
			TT-TT vs. CT-TT	3,56	1,27-9,98	**0,015**

[a]Orden de combinación genotípica: rs34330C>T-rs2066827T>G.

En resumen, el análisis individual de los polimorfismos rs34330 y rs2066827 localizados en el gen *CDKN1B* no permite revelar asociación con el cáncer de próstata en la muestra global, pero sí al valorar su interacción con diversos factores ambientales o su influencia conjunta en el inicio de la enfermedad. De hecho, en el análisis gen-gen es donde se pone especialmente de manifiesto la influencia de las variantes de estos marcadores en el PCa, alcanzando valores de alto impacto incluso en la muestra sin estratificar. Por lo tanto, la principal conclusión del estudio de estos marcadores es que el análisis conjunto de los SNPs puede fortalecer el poder predictivo con respecto del análisis individual. Tanto en el análisis de haplotipos como, especialmente, en el de combinaciones genotípicas se observa que ambos marcadores ejercen un efecto sobre el desarrollo del cáncer de próstata.

5.10. COMBINACIONES GENOTÍPICAS ENTRE MARCADORES.

En la presente tesis doctoral se ha examinado la influencia de una serie de marcadores genético-moleculares en el inicio del cáncer de próstata. No obstante, estos polimorfismos no presentan funciones aisladas en la célula, sino que muestran múltiples interacciones con otros involucrados en la misma ruta metabólica, principalmente vinculada a la apoptosis y, en menor medida, al control del ciclo celular. Por este motivo, en el trabajo se ha estudiado la influencia conjunta de polimorfismos con una estrecha relación a nivel funcional en el desarrollo del cáncer de próstata, con el objetivo de detectar posibles efectos sinérgicos o inhibitorios entre ellos.

A nivel individual solo se encuentra asociación estadísticamente significativa con el cáncer de próstata para 3 marcadores: el rs1045485 (*CASP8*), el rs1052576 (*CASP9*) y el rs9904341 (*BIRC5*). No obstante, en el análisis conjunto de polimorfismos se desvelan un elevado número de combinaciones genotípicas que muestran una influencia significativa en el desarrollo de la enfermedad (Tablas 102-109), bien vinculadas con un incremento en la susceptibilidad o, por el contrario, presentando cierto efecto protector. De este modo, aunque la mayoría de los polimorfismos manifiesta un bajo impacto en el desarrollo del cáncer de próstata, el análisis conjunto refuerza el efecto de cada uno de ellos, alcanzando la significación estadística. Además, al ser marcadores que intervienen en las mismas rutas metabólicas, los resultados del análisis combinado podrían reflejar, no solo una mera conjunción de efectos individuales, sino también posibles interacciones que podrían afectar al riesgo de desarrollar la enfermedad de un modo no estrictamente aditivo. En algunos casos estas interacciones podrían explicar algunos resultados contradictorios que se observan al comparar el análisis individual y combinado de algunos marcadores.

El primer grupo de análisis combinados involucra a los polimorfismos de los genes que intervienen en la vía extrínseca de la apoptosis, tales como *FAS*, *FASLG* y *CASP8* (Tabla 102). El sistema FAS-FASL transmite la señal de muerte celular al interior de la célula a través de la plataforma de reclutamiento DISC, donde se activa la caspasa-8. El máximo impacto sobre la susceptibilidad a la enfermedad se observa en la interacción entre el rs1800682 del gen *FAS* y el rs1045485 del gen *CASP8*. En los individuos portadores de la combinación genotípica AG-CG se observa un aumento en el riesgo de padecer PCa con respecto de aquellos portadores de cualquiera de las otras combinaciones genotípicas (OR= 2,56; p= 0,006). El riesgo de los sujetos con esta combinación genotípica llega a ser hasta 9 veces superior que el de aquellos con la combinación AG-CC.

Tabla 102. Interacciones genotípicas entre polimorfismos involucrados en la vía extrínseca de la apoptosis.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
FAS-CASP8 rs1800682A>G-rs1045485G>C	AA-GG AG-CG AG-GG AG-CC	53 36 79 1	79 12 78 3	AG-CG vs. AA-GG AG-CG vs. AG-GG AG-CG vs. AG-CC AG-CG vs. -	2,77 2,96 9,00 2,56	1,31-5,86 1,46-6,01 1,16-69,95 1,32-4,98	**0,007** **0,003** **0,034** **0,006**
FAS-CASP8 rs3740286A>G-rs1045485G>C	GG-GG AG-GG AG-CG	27 76 29	25 78 14	AG-CG vs. AG-GG AG-GG vs. - GG-GG vs. -	2,13 0,65 2,33	1,05-4,30 0,44-0,96 1,27-4,24	**0,036** **0,031** **0,006**
FAS-CASP8 rs10509561T>A-rs1045485G>C	AT-GG TT-CG	77 35	77 17	TT-CG vs. AT-GG	2,06	1,07-3,96	**0,030**
FASLG-CASP8 rs763110C>T-rs1045485G>C	CT-CG CT-GG	36 81	15 74	CT-CG vs. CT-GG CT-GG vs. -	2,19 1,98	1,12-4,30 1,05-3,70	**0,022** **0,033**

El segundo grupo de análisis combinados se relaciona con la caspasa-8, la cual es iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis y trasmisora de la señal de muerte celular, escindiendo y activando las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7 (Tabla 103). En este grupo de análisis se ha observado una influencia conjunta en el desarrollo de PCa para el rs1045485 del gen *CASP8* y los polimorfismos localizados en los genes *CASP3* y *CASP7*. En referencia a la interacción con la caspasa-3, el efecto conjunto más significativo se observa cuando se combina con el rs4647603, encontrandose un aumento significativo en la susceptibilidad en los individuos portadores de la combinación genotípica CG-CT en comparación con el resto de combinaciones (OR= 2,51; *p*= 0,034). El efecto de riesgo vinculado a los individuos con esta combinación se dispara hasta ser 12 veces mayor que el de aquellos con la combinación GG-TT.

En lo que respecta a la interacción de la caspasa-8 con el rs11196418 del gen *CASP7* se observa un notable aumento en el riesgo de cáncer de próstata para los sujetos portadores de la combinación CG-AG en comparación con aquellos GG-AA (OR= 6,00; *p*= 0,036) o CC-GG (OR= 6,00; *p*= 0,036).

Tabla 103. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la caspasa-8 y las caspasas ejecutoras -3 y -7.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
CASP8-CASP3 rs1045485G>C- rs1049216A>G	CG-AA GG-AA	44 94	20 92	CG-AA vs. GG-AA CG-AA vs. - GG-AA vs. -	2,15 1,86 0,66	1,19-3,91 1,06-3,27 0,45-0,97	**0,011** **0,030** **0,035**
CASP8-CASP3 rs1045485G>C- rs2705897G>T	CG-GG GG-GG	44 94	20 92	CG-GG vs. GG-GG CG-GG vs. - GG-GG vs. -	2,15 1,86 0,66	1,19-3,91 1,06-3,27 0,45-0,97	**0,011** **0,030** **0,035**
CASP8-CASP3 rs1045485G>C- rs4647603C>T	CG-CT GG-CC GG-CT GG-TT	21 116 54 1	7 98 48 4	CG-CT vs. GG-CC CG-CT vs. GG-CT CG-CT vs. GG-TT CG-CT vs. -	2,53 2,67 12,00 2,51	1,06-6,08 1,06-6,71 1,53-93,98 1,07-5,90	**0,037** **0,036** **0,016** **0,034**
CASP8-CASP7 rs1045485G>C- rs11196418G>A	CG-AG GG-AA CC-GG	18 2 2	9 6 6	CG-AG vs. GG-AA CG-AG vs. CC-GG	6,00 6,00	1,09-32,96 1,09-32,96	**0,036** **0,036**

La conexión entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis se produce mediante la escisión de la proteína Bid por parte de la caspasa-8 (Tabla 104). Esto permite la amplificación de la señal, de modo que se activan proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 y se libera el citocromo *c*, el cual recluta una serie de moléculas para formar el apoptosoma, activando la caspasa-9. En los análisis combinados de polimorfismos situados en los genes que codifican estas proteínas se observa una influencia conjunta de ambas caspasas iniciadoras en el desarrollo del cáncer de próstata. De este modo, los sujetos que llevan en su genoma la combinación genotípica formada por ambos genotipos heterocigotos (CG-GA) manifiestan un notable aumento en la predisposición al PCa con respecto de aquellos portadores de cualquiera de las otras combinaciones (OR= 4,73; $p<0,001$). Se trata de dos marcadores con un gran impacto en la enfermedad a nivel individual, lo cual se acentúa al valorar su interacción, obteniendo valores de *Odds Ratio* elevados y claramente significativos. El riesgo para los individuos con la combinación genotípica CG-GA se dispara cuando presentan una edad inferior a los 66 años, siendo hasta 12 veces superior que para los sujetos del mismo rango etario pero portadores de cualquiera de las otras combinaciones (OR= 12,00; $p= 0,003$).

La proteína Bcl-2 y la caspasa-9 son dos proteínas fundamentales en la vía intrínseca de la apoptosis (Tabla 104). Bcl-2 impide la liberación del citocromo *c* del espacio intermembrana mitocondrial al citosol, por lo que inhibe de forma indirecta la activación de la caspasa-9. En este trabajo se encuentra una interacción significativa entre el rs2279115 del *locus BCL2* y el rs1052576 del *locus CASP9*, con un efecto de riesgo para los individuos con la combinación AC-GA y protector para aquellos AC-AA. Se obtiene la máxima susceptibilidad al PCa cuando se comparan ambas combinaciones genotípicas (OR= 3,00; $p= 0,001$). Cabe destacar que el efecto de riesgo para los individuos con la combinación genotípica AC-GA llega a ser 5 veces superior que para aquellos AC-AA (OR= 5,29; $p= 0,027$) cuando son consumidores de una cantidad media-alta de tabaco (21-40,99 py)

Tabla 104. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
CASP8-CASP9 rs1045485G>C-rs1052576G>A	CG-GA GG-GG GG-AA CG-GG CG-AA	38 36 37 13 15	7 31 44 14 12	CG-GA vs. GG-GG CG-GA vs. GG-GA CG-GA vs. GG-AA CG-GA vs. CG-GG CG-GA vs. CG-AA CG-GA vs. - GG-AA vs. -	4,67 4,00 6,46 5,85 4,34 4,73 0,58	1,90-11,52 1,77-9,08 2,72-15,32 2,02-16,92 1,48-12,74 2,19-10,20 0,35-0,94	**0,001** **0,001** **<0,001** **0,001** **0,007** **<0,001** **0,025**
BCL2-CASP9 rs2279115C>A-rs1052576G>A	AA-GA AC-GA AC-AA AC-GG CC-GA	35 71 23 19 34	26 37 36 21 19	AC-GA vs. AC-AA AC-GA vs. AC-GG AC-GA vs. - CC-GA vs. AC-AA AA-GA vs. AC-AA AC-AA vs. -	3,00 2,12 1,71 2,80 2,11 0,45	1,57-5,75 1,02-4,41 1,09-2,68 1,31-6,00 1,02-4,36 0,26-0,78	**0,001** **0,044** **0,020** **0,008** **0,044** **0,004**

La caspasa-9, proteasa iniciadora de la vía intrínseca de la apoptosis, ejerce su función amplificadora de la señal activando las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7 (Tabla 105). En este trabajo, el rs1052576 del gen *CASP9* presenta una interacción con los polimorfismos correspondientes a los genes *CASP3* y *CASP7*. En combinación con el rs1049216 se observa un aumento en la susceptibilidad para los portadores de la combinación GA-AA en relación con sujetos con el resto de combinaciones posibles, especialmente, en relación a aquellos AA-AA (OR= 2,26; *p*= 0,009).

En cuanto a la relación de la caspasa-9 con el rs4647603 (Tabla 105), se observa una predisposición mayor a la enfermedad para los individuos con la combinación genotípica GA-CT y una menor susceptibilidad para aquellos AA-CC. Finalmente, también se observa una asociación del polimorfismo de la caspasa-9 con el rs11196418 de la caspasa-7, con un incremento en la susceptibilidad para los varones portadores de la combinación GA-GG, sobre todo en comparación con aquellos AA-AG (OR= 2,58; *p*= 0,019).

Tabla 105. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la caspasa-9 y las capasas ejecutoras -3 y -7.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
CASP9-CASP3 rs1052576G>A-rs1049216A>G	GA-AA AA-AA GG-AA GA-AG	88 26 29 44	51 34 32 26	GA-AA vs. AA-AA GA-AA vs. GG-AA GA-AA vs. - GA-AG vs. AA-AA AA-AA vs. -	2,26 1,90 1,58 2,21 0,56	1,22-4,16 1,04-3,49 1,04-2,39 1,10-4,47 0,32-0,96	**0,009** **0,037** **0,031** **0,026** **0,035**
CASP9-CASP3 rs1052576G>A-rs2705897G>T	GA-GG AA-GG GG-GG GA-GT	88 26 29 44	51 34 32 26	GA-GG vs. AA-GG GA-GG vs. GG-GG GA-GG vs. - GA-GT vs. AA-GG AA-GG vs. -	2,26 1,90 1,58 2,21 0,56	1,22-4,16 1,04-3,49 1,04-2,39 1,10-4,47 0,32-0,96	**0,009** **0,037** **0,031** **0,026** **0,035**
CASP9-CASP3 rs1052576G>A-rs4647603C>T	GA-CT AA-CC AA-CT GG-CT GA-CC	48 33 16 13 91	22 42 18 16 58	GA-CT vs. AA-CC GA-CT vs. AA-CT GA-CT vs. GG-CT GA-CT vs. - GA-CC vs. AA-CC AA-CC vs. -	2,78 2,45 2,69 1,88 2,00 0,55	1,41-5,45 1,06-5,66 1,11-6,48 1,10-3,24 1,14-3,50 0,34-0,91	**0,003** **0,034** **0,027** **0,021** **0,015** **0,020**
CASP9-CASP7 rs1052576G>A-rs11196418G>A	AA-AG GA-GG AA-GG GG-GG	12 100 40 37	17 55 41 37	GA-GG vs. AA-AG GA-GG vs. AA-GG GA-GG vs. GG-GG GA-GG vs. -	2,58 1,86 1,82 1,68	1,16-5,70 1,08-3,21 1,04-3,18 1,13-2,53	**0,019** **0,025** **0,036** **0,011**

La proteína survivina, codificada por el gen *BIRC5*, desempeña su papel anti-apoptótico, principalmente, ejerciendo un efecto inhibitorio directo sobre las caspasas. Además, impide la degradación del MDM2, lo que permite que éste actúe como un inhibidor del p53. Se ha encontrado un efecto combinado significativo entre los dos polimorfismos estudiados de la survivina y polimorfismos en genes sobre los que ejerce su inhibición, lo que parece indicar que contribuyen conjuntamente a modular el riesgo a desarrollar cáncer de próstata (Tabla 106).

Este efecto conjunto alcanza su mayor magnitud cuando se combinan el polimorfismo rs8073069 de la survivina y el rs1049216 de la caspasa-3. De este modo, los individuos portadores de la combinación genotípica CG-GG manifiestan un riesgo al PCa más de 7 veces superior que aquellos portadores de cualquiera de las otras combinaciones (OR=7,29; *p*=0,029) y hasta 10 veces mayor que los que son GG-GG (OR= 10,50; *p*= 0,029). Estos resultados son especialmente llamativos si tenemos en cuenta la ausencia de evidencia estadística en el análisis individual de cualquiera de los dos polimorfismos. En línea con el DL completo del rs1049216 con el rs2705897, se obtiene una predisposición idéntica para los sujetos con la combinación CG-TT.

Por otra parte, el rs9904341 de la survivina manifiesta su máximo efecto sobre la carcinogénesis prostática en combinación con el rs1052576 de la caspasa-9 (Tabla 106). Aunque se observa un elevado número de comparaciones de alto impacto, en general se obtiene un aumento en la predisposición al cáncer de próstata para portadores del genotipo CC o GG de la survivina en combinación con el heterocigoto GA de la caspasa-9, siendo en el primer

caso ligeramente superior (OR= 2,35; *p*= 0,022). Se encuentra una tendencia similar al análisis individual de ambos marcadores, ejerciendo los genotipos CC y GA, respectivamente, la máxima susceptibilidad frente a la enfermedad.

Se observan interacciones significativas del rs9904341 con los tres marcadores del *locus CASP3* (Tabla 106). La influencia conjunta en combinación con los polimorfismos rs1049216 y rs2705897 parece ser inferior que la observada en relación con el otro marcador de la survivina estudiado (rs8073069). En cuanto a la interacción con el rs4647603, se observa un aumento en el riesgo de PCa para los individuos con la combinación genotípica CC-CT, especialmente en referencia a aquellos que son CG-CT (OR= 3,53; *p*= 0,016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 106. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por la survivina.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
BIRC5-CASP3 rs8073069G>C-rs1049216A>G	CG-GG CC-AA CG-AA CG-AG GG-AA GG-AG GG-GG	9 9 43 31 90 42 6	1 9 39 25 68 36 7	CG-GG vs. CC-AA CG-GG vs. CG-AA CG-GG vs. CG-AG CG-GG vs. GG-AA CG-GG vs. GG-AG CG-GG vs. GG-GG CG-GG vs. -	9,00 8,16 7,26 6,80 7,71 10,50 7,29	1,13-71,47 1,31-50,84 1,09-48,31 1,09-42,38 1,22-48,91 1,22-90,42 1,23-43,27	**0,034** **0,024** **0,039** **0,039** **0,029** **0,029** **0,029**
BIRC5-CASP3 rs8073069G>C-rs2705897G>T	CG-TT CC-GG CG-GG CG-GT GG-GG GG-GT GG-TT	9 9 43 31 90 42 6	1 9 39 25 68 36 7	CG-TT vs. CC-GG CG-TT vs. CG-GG CG-TT vs. CG-GT CG-TT vs. GG-GG CG-TT vs. GG-GT CG-TT vs. GG-TT CG-TT vs. -	9,00 8,16 7,26 6,80 7,71 10,50 7,29	1,13-71,47 1,31-50,84 1,09-48,31 1,09-42,38 1,22-48,91 1,22-90,42 1,23-43,27	**0,034** **0,024** **0,039** **0,039** **0,029** **0,029** **0,029**
BIRC5-MDM2 rs8073069G>C-rs937283A>G	GG-GA	75	83	GG-GA vs. -	0,68	0,47-0,99	**0,042**
BIRC5-CASP3 rs9904341G>C-rs1049216A>G	CC-AA CG-AA	33 55	14 58	CC-AA vs. CG-AA CC-AA vs. -	2,49 2,01	1,21-5,09 1,05-3,85	**0,013** **0,034**
BIRC5-CASP3 rs9904341G>C-rs2705897G>T	CC-GG CG-GG	33 55	14 58	CC-GG vs. CG-GG CC-GG vs. -	2,49 2,01	1,21-5,09 1,05-3,85	**0,013** **0,034**
BIRC5-CASP3 rs9904341G>C-rs4647603C>T	CC-CT CG-CC CG-CT	19 64 26	6 57 29	CC-CT vs. CG-CC CC-CT vs. CG-CT CC-CT vs. -	2,82 3,53 2,64	1,08-7,37 1,25-9,96 1,06-6,54	**0,034** **0,016** **0,036**
BIRC5-CASP9 rs9904341G>C-rs1052576G>A	CC-GA GG-AA CG-AA CG-GG GG-GA GG-GG	28 24 54 17 55 27	10 30 42 25 29 17	CC-GA vs. GG-AA CC-GA vs. CG-AA CC-GA vs. CG-GG CC-GA vs. - GG-GA vs. GG-AA GG-GA vs. CG-AA GG-GA vs. CG-GG CG-GG vs. -	3,50 3,24 4,12 2,35 2,37 2,20 2,79 0,50	1,44-8,49 1,27-8,28 1,62-10,47 1,13-4,89 1,18-4,76 1,03-4,68 1,31-5,93 0,26-0,94	**0,005** **0,013** **0,003** **0,022** **0,015** **0,041** **0,008** **0,032**
BIRC5-MDM2 rs9904341G>C-rs937283A>G	GG-AA CG-GA	48 42	29 48	GG-AA vs. CG-GA	1,89	1,02-3,51	**0,043**

Numerosos genes presentan elementos de respuesta al p53 en sus regiones promotoras que permiten regular su expresión génica, entre ellos el *BIRC5*, codificador de la proteína survivina. En este trabajo se ha desvelado una interacción entre el polimorfismo del p53 estudiado (rs1042522) y el rs9904341 de la survivina (Tabla 107). Los individuos con la combinación de heterocigotos correspondientes a ambos marcadores (GC-CG) manifiestan un descenso en el riesgo de sufrir cáncer de próstata (OR= 0,58; *p*= 0,048).

En este trabajo también se desvela una influencia conjunta del SNP del p53 y el rs10509561 correspondiente al *locus FAS*. El p53 aumenta la sensibilidad de las células a la apoptosis actuando sobre el receptor FAS, tanto de forma transcripcional como postraduccionalmente. En este sentido, se ha visto una disminución en la predisposición al cáncer de próstata para los individuos portadores de la combinación genotípica GC-AT (OR= 0,55; *p*= 0,027) (Tabla 107).

En el estudio, se observa, además, una interacción entre los marcadores del gen *TP53* y *CASP9*, cuyos productos proteicos presentan funciones relevantes en la vía intrínseca de la apoptosis (Tabla 107). Los resultados ponen de relieve un efecto protector para los sujetos con el genotipo GC en el rs1042522 (*TP53*) y con el AA correspondiente al rs1052576 (*CASP9*), observándose un *Odds Ratio* de 0,48 (*p*= 0,022).

Tabla 107. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por el p53.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
TP53-CASP9 rs1042522G>C-rs1052576G>A	GC-AA	16	25	GG-GA vs. GG-AA	1,80	1,01-3,23	**0,047**
	GG-GA	90	53	GG-GA vs. GC-AA	2,65	1,31-5,35	**0,006**
	GC-GA	43	22	GG-GA vs. -	1,54	1,02-2,32	**0,039**
	GG-AA	33	25	GC-GA vs. GG-AA	2,07	1,03-4,17	**0,040**
				GC-GA vs. GC-AA	3,05	1,37-6,82	**0,006**
				GC-AA vs. -	0,48	0,25-0,90	**0,022**
TP53-BIRC5 rs1042522G>C-rs9904341G>C	GG-CC	28	15	GG-CC vs. GC-CG	2,35	1,05-5,24	**0,036**
	GC-CG	27	34	GC-CG vs. -	0,58	0,34-1,00	**0,048**
TP53-FAS rs1042522G>C-rs10509561T>A	GG-AA	20	10	GG-AA vs. GC-AT	2,64	1,08-6,47	**0,033**
	GC-AT	28	37	GC-TT vs. GC-AT	2,53	1,26-5,09	**0,009**
	GC-TT	44	23	GC-AT vs. -	0,55	0,33-0,94	**0,027**

La proteína p21, codificada por el gen *CDKN1A*, ejerce un efecto anti-apoptótico en el citoplasma de la célula inhibiendo la función de varias caspasas, entre ellas la caspasa-3 y la caspasa-8. Se ha observado una interacción significativa del polimorfismo estudiado del *locus CDKN1A* (rs2395655) con el rs1049216 del locus *CASP3* (Tabla 108), desvelando un aumento en la susceptibilidad para los individuos con la combinación genotípica GG-AG (OR= 2,24; *p*= 0,025). Los resultados son idénticos para aquellos con la combinación rs2395655GG-rs2705897GT.

En este estudio también se observa una asociación del polimorfismo del *CDKN1A* con el rs1045485 del gen *CASP8*, de modo que los individuos con la combinación AA-CG muestran

un incremento en el riesgo de padecer PCa con respecto a sujetos con el resto de combinaciones posibles (OR= 2,57; *p*= 0,042) (Tabla 108).

Por otra parte, la proteína p21 ejerce un efecto inhibitorio sobre la survivina, la cual resulta fundamental para la correcta alineación del huso mitótico durante la progresión del ciclo celular. La predisposición genética al cáncer de próstata para los varones con la combinación genotípica rs2395655AA-rs8073069CC es más de 10 superior que la observada para aquellos con la combinación AG-CC (Tabla 108).

Tabla 108. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por el p21.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
CDKN1A-CASP3 rs2395655A>G-rs1049216A>G	GG-AA GG-AG AA-AG AG-AG AG-AA	26 29 21 33 79	27 11 19 35 64	GG-AG vs. GG-AA GG-AG vs. AG-AG GG-AG vs. AG-AA GG-AG vs. -	2,74 2,80 2,14 2,24	1,15-6,55 1,22-6,43 1,00-4,57 1,10-4,54	**0,023** **0,015** **0,050** **0,025**
CDKN1A-CASP3 rs2395655A>G-rs2705897G>T	GG-GG GG-GT AA-GT AG-GT AG-GG	26 29 21 33 79	27 11 19 35 64	GG-GT vs. GG-GG GG-GT vs. AG-GT GG-GT vs. AG-GG GG-GT vs. -	2,74 2,80 2,14 2,24	1,15-6,55 1,22-6,43 1,00-4,57 1,10-4,54	**0,023** **0,015** **0,050** **0,025**
CDKN1A-CASP8 rs2395655A>G-rs1045485G>C	AA-CG AA-GG AG-GG	19 44 90	6 41 87	AA-CG vs. AA-GG AA-CG vs. AG-GG AA-CG vs. -	2,95 3,06 2,57	1,10-7,94 1,21-7,76 1,03-6,38	**0,031** **0,018** **0,042**
CDKN1A-BIRC5 rs2395655A>G-rs8073069G>C	AG-CC AA-CC	6 7	9 1	AA-CC vs. AG-CC	10,50	1,22-90,42	**0,029**

Finalmente, en este estudio se observa una interacción entre las dos proteínas inhibidoras del ciclo celular, p21 y p27, codificadas por los genes *CDKN1A* y *CDKN1B*, respectivamente (Tabla 109). Al combinar el rs2395655 (*CDKN1A*) y el rs34330 (*CDKN1B*) se observa que los individuos que son AG-CT manifiestan un descenso en el riesgo de padecer la enfermedad en comparación con una variedad de combinaciones genotípicas. El efecto protector de esta combinación genotípica se ve más claramente cuando se compara con la AG-TT (OR= 0,32; *p*= 0,041).

Se ha sugerido un papel en la detención del ciclo celular en la fase G_0 para la proteína Bcl-2 por medio del aumento en los niveles del inhibidor p27. Los resultados de este estudio indican un efecto combinado en la susceptibilidad al PCa para el rs2279115 (*BCL2)* y el rs34330 (*CDKN1B),* observándose valores de OR de alto impacto (Tabla 109). Los varones que presentan la combinación genotípica CC-CT son menos susceptibles a padecer esta enfermedad, sobre todo en comparación con aquellos que llevan en el genoma las combinaciones AA-TT (OR= 0,18; *p*= 0,030) o CC-TT (OR= 0,21; *p*= 0,050).

Tabla 109. Interacciones genotípicas entre polimorfismos reguladores del ciclo celular.

Combinación genotípica	Genotipo	Casos	Controles	Modelo	OR	IC 95%	*p*
CDKN1A-CDKN1B rs2395655A>G-rs2066827T>G	AA-TT AG-TT	38 59	19 63	AA-TT vs. AG-TT	2,14	1,11-4,10	**0,022**
CDKN1A-CDKN1B rs2395655A>G-rs34330C>T	AG-CC AG-CT GG-CC AA-CT AG-TT	72 42 29 35 12	49 54 17 23 5	AG-CC vs. AG-CT GG-CC vs. AG-CT AA-CT vs. AG-CT AG-TT vs. AG-CT	1,89 2,19 1,96 3,09	1,10-3,25 1,07-4,50 1,01-3,79 1,04-9,14	**0,021** **0,031** **0,046** **0,041**
BCL2-CDKN1B rs2279115C>A-rs34330C>T	AA-TT CC-TT AC-CT CC-CT CC-CC AC-CC AA-CC	8 7 49 18 33 58 31	2 2 50 25 15 38 32	AA-TT vs. CC-CT CC-TT vs. CC-CT AC-CC vs. CC-CT CC-CT vs. - CC-CC vs. AC-CT CC-CC vs. CC-CT CC-CC vs. AA-CC	5,56 4,86 2,12 0,53 2,24 3,06 2,27	1,17-26,48 0,99-23,98 1,02-4,39 0,28-1,00 1,09-4,62 1,30-7,17 1,04-4,97	**0,030** **0,050** **0,042** **0,048** **0,028** **0,010** **0,039**

En resumen, el análisis combinado de marcadores permite detectar interacciones entre ellos, modulando conjuntamente la predisposición a desarrollar cáncer de próstata. En muchos casos se pone de manifiesto el efecto de riesgo/protección de ciertos genotipos que pudieran pasar desapercibidos en su estudio de forma individual. Por consiguiente, el estudio en bloque de polimorfismos involucrados en la misma ruta metabólica puede ser una herramienta útil para establecer perfiles genéticos que permitan predecir la susceptibilidad individual a desarrollar una determinada enfermedad, en este caso, el cáncer de próstata, abriendo el camino hacia una medicina más personalizada.

5.11. DISCUSIÓN GENERAL.

La versatilidad es una de las características más relevantes de la expresión biológica. Tal versatilidad se manifiesta en las diferentes respuestas que el organismo ofrece ante diversos requerimientos del entorno. Tal fenómeno se pone de relieve, no solo en el organismo completo, sino también en la propia unidad elemental, la célula. Las diferentes condiciones en las que la vida está inmersa requieren respuestas adecuadas para la supervivencia, no solo del individuo, sino también de la propia célula. El organismo manifiesta una variedad de respuestas atendiendo a las necesidades requeridas. En ese sentido, tal versatilidad es sinónimo de adaptación. La manifestación biológica no es algo inmutable, sino que presenta un carácter dinámico, respondiendo a las necesidades requeridas, y, como tal, tiene un significado adaptativo.

En el nivel más elemental, es decir, en la célula, sabemos que es el ADN, el material genético, el que controla toda expresión biológica. Desde un punto de vista estructural, el ADN, como concatenación de secuencias específicas de los cuatro nucleótidos elementales, parecía ser una estructura inmutable. Desde un punto de vista meramente estructural tal es así, sin embargo, la realidad biológica nos dice que una misma secuencia nucleotídica puede responder de maneras diferentes dependiendo de las condiciones del entorno celular. En ese sentido, se da la aparente paradoja de que una estructura determinada y específica conduce a diferentes modos en su expresión genética. De esta forma, se establece una interrelación entre la estructura (estática) del ADN y las condiciones del entorno celular.

A lo que estamos refiriéndonos es que no podemos entender adecuadamente la expresión biológica de la célula o del organismo si prescindimos de las diferentes condiciones ambientales. Es decir, las condiciones del entorno celular se convierten en un elemento clave para poder explicar el modo en el que se produce la expresión genética. Referido a nuestro estudio, las diferentes expresiones genéticas pueden estar condicionadas por la secuencia nucleotídica del material genético de partida. Es decir, dependiendo de las diferentes variantes alélicas se explicará que unas manifestaciones biológicas sean más adecuadas, y con ello, más adaptativas, en tanto que otras manifestaciones biológicas serán adaptativamente disfuncionales. Esa disfuncionalidad puede conllevar al desarrollo de una patología o, en los casos más severos, a la letalidad. Es decir, en el caso que nos ocupa, el cáncer de próstata es una consecuencia patológica inherente a la expresión genética que determina la célula como respuesta a las diversas condiciones del entorno celular.

Diferentes condiciones del entorno van a permitir poner de manifiesto diferentes tipos de expresión genética. En ausencia de tales condiciones, las diferentes expresiones pueden pasar desapercibidas. Es decir, que el impacto de la variabilidad nucleotídica y, con ello, de la variabilidad alélica podrá salir a la luz o no dependiendo de a qué condiciones del entorno celular nos estamos refiriendo. En otras palabras, la evidencia de la disfuncionalidad de tales variantes alélicas puede pasar desapercibida si no concurren las condiciones ambientales que posibilitan que se pueda poner de manifiesto. A lo largo de la presente tesis doctoral se ha analizado el impacto de la variabilidad alélica de los diferentes *rs* y el riesgo a desarrollar PCa. Cuando en una primera aproximación valoramos tal impacto a través del valor de OR, observamos que tan solo en 3 de los *loci* analizados (*CASP8*, *CASP9*, *BIRC5*) se registran globalmente asociaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, para el 85% de los *rs* examinados, la variabilidad alélica aparentemente no confiere valores significativos de riesgo/protección. La perspectiva del análisis global agrupa a un heterogéneo abanico de diferentes combinaciones de factores ambientales. El efecto simultáneo de un elevado número de condiciones ambientales condiciona la posibilidad de poner de manifiesto el impacto de la

variabilidad alélica en términos de funcionalidad biológica. En consecuencia, se produce, cuando analizamos los datos globales, un efecto de atenuación que explicaría que finalmente los ORs no registren diferencias significativas en la inmensa mayoría de los *loci* analizados.

Atendiendo a lo referido anteriormente, el análisis del impacto de la variabilidad alélica cuando se contempla desde una perspectiva global (heterogénea) no se ajusta a la biología de la célula. El material genético está inmerso en la célula, pero no es un compartimento estanco, sino que hay una interrelación entre la secuencia nucleotídica del material genético y las diferentes condiciones del entorno celular. Las diferentes condiciones de la célula van a demandar una respuesta por parte del material genético. Esta respuesta podrá ser funcional o disfuncional dependiendo de las posibilidades que el material genético disponga como tal. Es decir, en último extremo, la secuencia nucleotídica del ADN va a posibilitar una respuesta adecuada o no a las exigencias del entorno celular. En otras palabras, la variabilidad alélica podrá explicar así un riesgo diferencial, habida cuenta de que ésta conduce a una diferente eficacia en la respuesta biológica.

Llegados a este punto resulta evidente que la contemplación global no permite ofrecer una aproximación adecuada al impacto funcional de la variabilidad alélica. Necesitamos examinar la interacción genoma-entorno celular que dote de significado funcional dicha variabilidad alélica.

Ahora bien, el entorno celular no es un parámetro único, estático. El entorno celular es variable. Esa variabilidad se refleja, no solo por el diferente grado de incidencia de los factores ambientales individuales, sino además, en las combinaciones resultantes de la integración de los mismos, lo que hace el análisis más complejo, pero necesario.

En aras de ofrecer una visión más adecuada a la propia realidad biológica, creemos necesario desarrollar análisis de estratificación de las variables consideradas. En nuestro trabajo hemos seleccionado tres aspectos clave del entorno celular: el tabaquismo, el índice de masa corporal y la edad del individuo. El tabaquismo es un factor que presenta una notable incidencia en la sociedad actual. Los hábitos tabáquicos conllevan una cuestión fundamental, el estrés celular derivado de la exposición a compuestos carcinogénicos. El índice de masa corporal se va a relacionar con otro fenómeno vigente en las sociedades actuales, que es la obesidad y la influencia que el desarrollo del tejido adiposo y, con ello, las adipokinas, pueden ejercer en el entorno celular. La edad se relaciona con una cuestión clave, el grado de envejecimiento de la célula. A medida que se incrementa la edad va aumentando lenta y progresivamente el estrés oxidativo y disminuyendo la capacidad de reparación del material genético. La selección de esas tres variables nos ofrece una visión relativamente amplia, ya que inciden en el entorno celular asociado a las características de las sociedades actuales. Obviamente estas tres variables no engloban, ni de lejos, los múltiples factores que inciden en el organismo, pero sí contemplan tres componentes clave de la realidad del entorno en el que se desarrolla el hombre actual. Comprendemos así que mediante los análisis de estratificación se ponen de manifiesto diferentes grados de impacto inherentes a la variabilidad genética, que pasa desapercibida cuando meramente desarrollamos un análisis de los datos agrupados. Así, tras los análisis de estratificación encontramos que, dependiendo de las variables y de los segmentos definidos, se manifiesta un impacto diferencial en el 85% de los *rs* analizados.

Los análisis globales incurren en una limitación de partida: se prescinde del diálogo genoma-entorno. Cuando contemplamos tal interacción a través de los análisis de estratificación sale a la luz el impacto diferencial de la variabilidad alélica. El entorno no es

algo único, predefinido, sino que es una variable enormemente cambiante y diversa. Prescindir en los análisis del impacto de tal factor conlleva a resultados artificiosos alejados de la propia realidad biológica. Así, una variante alélica o un genotipo puede ser catalogado como selectivamente neutro, es decir, carente de impacto/protección, tras un análisis de datos globales y, sin embargo, la estratificación indicar un notable impacto para tal variante o genotipo en estratos concretos de la población.

Así, por ejemplo, en el análisis del *CDKN1A* (rs2395655) a nivel global observamos un comportamiento neutro del marcador en relación a la enfermedad. Se observa un OR de 1,18 en la comparación GG vs. AA y de 1,31 en la GG vs. AG. Estos resultados nos indican que la diferencia entre las variantes alélicas G y A en el riesgo a desarrollar PCa apenas son reseñables. Sin embargo, cuando se estratifica la muestra por el tabaquismo, vemos que el riesgo que comporta el genotipo GG en los individuos fumadores (≥36 *pack-years*) se duplica en referencia a la de aquellos con la variante protectora A. Se observan así *Odds Ratios* de 2,20 (GG vs. AA) o de 2,40 (GG vs. AG). Los individuos fumadores carentes del alelo A tendrán, por lo tanto, el doble de riesgo de desarrollar la enfermedad que aquellos portadores de tal variante.

Un caso que ejemplifica bien la relación con el IMC corresponde al *locus* CASP3 (rs4647603). Al llevar a cabo el análisis de asociación de este *rs* con la enfermedad a nivel general se observa un *Odds Ratio* de 1,04 en la comparación de alelos (T vs. C). No obstante, cuando se analiza la interrelación con el IMC, el alelo T pasa de tener un comportamiento neutro a nivel general a otro de riesgo en los individuos obesos (IMC ≥31). Se observa así un OR de 3,58 en el modelo alélico, indicándonos que la susceptibilidad asociada a la variante alélica T se triplica en comparación con la correspondiente al alelo C. Es más, cuando esta obesidad es extrema (IMC ≥33), el impacto de este alelo se acentúa hasta ser un 500% mayor que la de portadores del alelo C.

En el estudio también se desvela una interrelación de la edad con la variabilidad alélica. Se pone el ejemplo del *locus BIRC5* (rs9904341). En una primera valoración de la muestra ya se observaba un efecto de riesgo para el genotipo CC en comparación, especialmente, con aquel CG (OR= 1,91). Sin embargo, no es sino en los individuos con una edad avanzada (≥73 años) donde el efecto de tal genotipo se pone especialmente de relieve. Así, los individuos con el alelo C en homocigosis manifestaron un riesgo a desarrollar la enfermedad casi 6 veces superior en referencia a aquellos con el genotipo heterocigoto (OR= 5,83).

Estos ejemplos ilustran la realidad biológica, lo que significa, en otras palabras, que un mismo genotipo puede ser neutro o de riesgo/protectivo dependiendo del entorno celular. Este aspecto ha sido reiteradamente puesto de manifiesto a lo largo de esta memoria y constituye uno de los pilares fundamentales sobre el que hemos desarrollado el proyecto. No podemos contemplar conceptos como riesgo, protección o neutralidad como algo predefinido e inmutable. La propia interacción genoma-entorno es la que confiere el significado, arroja luz sobre el verdadero significado funcional o patológico. Es por eso que esta perspectiva reiterada se ha recalcado a lo largo de esta memoria. Es decir, debemos superar la visión estática de definir variantes alélicas de riesgo "*per se"*. Es imprescindible acotar y definir, asimismo, las condiciones de vida del individuo en concreto para valorar el significado del impacto.

El valor de índice de masa corporal ha sido aplicado en este estudio como una de las variables de estratificación. Si bien se han descrito otros índices para valorar las proporciones corporales es, sin duda, el IMC el que tiene, a día de hoy, la mayor universalidad y aceptación. Indirectamente estamos valorando, no tanto el peso del individuo sino el grado de desarrollo

somático y, con ello, indirectamente, el grado de desarrollo de tejido graso. Obviamente el peso en sí no proporciona una visión adecuada habida cuenta que es necesario referir tal peso corporal a la envergadura general del individuo. Indirectamente se está intentando valorar el grado de desarrollo del tejido adiposo.

Observamos que una gran parte de los *rs* que presentan relación con el IMC corresponden a intervalos de impacto o bien de sobrepeso o bien de obesidad. Ejemplos de la influencia de la obesidad (IMC ≥30) corresponden a los *loci CASP9*, *CASP3*, *MDM2* o *FAS***.** No obstante, el sobrepeso puede ser también un factor de riesgo en su interacción con la variabilidad alélica en los *loci CASP3*, *BIRC5*, *MDM2* o *CDKN1B*. La obesidad es un problema que afecta a un amplio sector de los individuos en las sociedades del contexto actual, en tanto que el 39% de la población global presenta sobrepeso o algún grado de obesidad (OMS; Gui *et al*., 2017). Diversos estudios han demostrado una estrecha relación entre la obesidad y el riesgo a desarrollar distintos tipos de cáncer, entre ellos el de próstata (Mistry, Digby, Desai & Randeva, 2007; Moore *et al*., 2009).

A modo de ejemplo, en el MDM2 (rs937283), el alelo G presenta un comportamiento de riesgo frente al alelo A. Los valores globales indican valores de OR igual a 1,37 (GG vs. AA) y 1,69 (GG vs. GA). Tales valores no conllevan un riesgo relevante y el valor de *p* resultante es no significativo cuando se analizan los datos globales. Ahora bien, cuando contemplamos el valor del IMC encontramos que en los individuos obesos, concretamente en aquellos con un IMC igual o superior a 33, el riesgo de los varones portadores del genotipo GG se incrementa notablemente. Esto es, se obtiene un OR de 5,60 cuando se compara el efecto del genotipo GG en comparación con el AA. Los individuos obesos con el genotipo GG aumentan hasta un 800% el riesgo de desarrollar PCa en comparación con aquellos con el genotipo GA. En otras palabras, los individuos carentes del alelo A conllevan un riesgo a desarrollar PCa que va del 500% al 800% frente a los individuos portadores de al menos una copia de la variante protectiva A. Estos resultados son especialmente relevantes si tenemos en cuenta que más del 11% de nuestra población de estudio presenta valores de IMC iguales o superiores a 33.

Este aspecto pasa desapercibido cuando se efectúan los análisis globales. En la muestra global no solo consideramos individuos con un IMC ≥33 sino que existe una heterogeneidad de valores de IMC que amortiguan el impacto y significado funcional de los portadores de los alelos G y A. Por el contrario, la estratificación nos está señalando que, en la población, los individuos obesos portadores del genotipo GG van a desarrollar un riesgo notablemente superior frente a los restantes genotipos. Sin embargo, este mismo genotipo presenta un comportamiento neutro en los sujetos que no presentan tal obesidad. Es un ejemplo que ilustra lo que queremos reflejar. La realidad del individuo concreto es la obesidad, esa es la realidad del entorno celular en la que su genoma está inmerso. La miscelánea de valores de IMC que ofrecen los datos globales pasa por alto tal impacto, es decir, el efecto diferencial de las variantes pasa desapercibido. Por ello, el riesgo siempre debe referirse a la realidad biológica celular concreta.

Lo mismo podría decirse para otros *loci*, como el *FAS* (rs3740286) o el *CDKN1B* (rs34330). En el primer caso se observan *Odds Ratio* de 6,12 (AA vs. AG) o 10,00 (AA vs. GG) en personas con un IMC igual o superior a 33. Esto implica que los individuos obesos carentes del alelo protector G manifiestan de 6 a 10 veces más riesgo de padecer la enfermedad que aquellos con tal variante. En referencia al *CDKN1B*, la susceptibilidad diferente al cáncer de próstata se pone de manifiesto ya en personas con sobrepeso (IMC ≥25), donde portar el genotipo TT triplica el riesgo a la enfermedad en comparación con llevar el alelo C (OR= 3,44).

La obesidad es el resultado de la acumulación del tejido adiposo blanco (WAT), el cual funciona como un órgano endocrino secretor de una variedad de adipokinas (Mistry *et al*., 2007). Las adipokinas son factores de crecimiento hormonales, moduladores de procesos como la diferenciación celular, la apoptosis, la proliferación o la angiogénesis (Gui *et al*., 2017; Mistry *et al*., 2007). En las personas obesas se produce una secreción excesiva de adipokinas perjudiciales, tales como la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleuquina-6 (IL-6) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Por el contrario, en los individuos con obesidad se ha descrito una disminución en la secreción de adipokinas con efectos beneficiosos, destacando especialmente la adiponectina (Gui *et al*., 2017; Mistry *et al*., 2007). Las adipokinas se consideran los intermediarios moleculares clave que median la relación entre la obesidad y el cáncer (Moore *et al*., 2009).

Las células del cáncer de próstata están expuestas a las adipokinas a través de la circulación o por medio de la producción local de adipokinas en el área retropúbica. Niveles elevados de leptina, IL-6 y VEGF se han vinculado con un incremento en el riesgo de cáncer de próstata así como con una mayor agresividad. Por el contrario, en pacientes con PCa se han detectado niveles bajos de adiponectina, correlacionándose inversamente con el grado de agresividad (Mistry *et al*., 2007).

Los efectos biológicos de las adipokinas en el organismo son diversos. La leptina es una hormona neuroendocrina que contribuye al control del peso corporal regulando el balance de energía y el metabolismo lipídico (Moore *et al*., 2009). Esta adipokina se ha vinculado con efectos proliferativos y angiogénicos, induciendo la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor de crecimiento fibroblástico (FCF). Se ha asociado, por lo tanto, con una mayor probabilidad de metástasis y mortalidad en el cáncer de próstata (Moore *et al*., 2009; Wein *et al*., 2008). Otras adipokinas, como el TNF-α, presentan actividad proinflamatoria (Moore *et al*., 2009). Se ha visto que un estado proinflamatorio crónico puede conducir al desarrollo de un cáncer de próstata de varias formas: estimulando la angiogénesis, la hiperproliferación celular o el daño al ADN por medio de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Hsing & Chokkalingam, 2006; Wein *et al*., 2008). En cuanto a la adiponectina, está involucrada en la regulación de la glucosa y los ácidos grasos. Esta citoquina se ha asociado con efectos anti-tumorigénicos tales como la inhibición de la proliferación celular y la angiogénesis o el aumento de la apoptosis, entre otros (Dalamaga *et al*., 2012; Moore *et al*., 2009; Palomer *et al*., 2005).

En los individuos obesos también se genera un estado de hiperinsulinemia, incrementándose los niveles de hormonas como los factores de crecimiento tipo insulina (IGFs), con actividades mitogénicas y anti-apoptóticas (Herrera-Covarrubias *et al*., 2015; López-Fontana *et al*., 2009; Mistry *et al*., 2007). Del mismo modo, la obesidad conduce a una disminución de la testosterona en hombres, lo cual proporciona un ambiente adecuado para el desarrollo de un cáncer de próstata insensible a los andrógenos. En este sentido, la acumulación de tejido adiposo estaría vinculada con una mayor incidencia de tumores más agresivos y pobremente diferenciados (Mistry *et al*., 2007). Relacionado con la obesidad, en la dieta occidental se produce un incremento en la ingesta de ácidos grasos saturados, como el ácido linoleico. Esto puede contribuir al desarrollo de un cáncer de próstata agresivo ya que este tipo de ácidos grasos promueven el crecimiento y la migración de las células de la próstata (Mistry *et al*., 2007).

Todos estos factores que se han citado anteriormente proporcionan las bases moleculares que explican la alteración en el medio celular y que pueden conllevar al desarrollo del PCa.

Tales mecanismos bioquímicos estarían respaldados por la observación de que en nuestro estudio se pone de manifiesto, en mayor o menor medida, una estrecha relación entre la obesidad y el riesgo a desarrollar PCa. En este sentido, en un *locus* determinado, el grado en que se manifiesta la protección/riesgo de una u otra variante alélica dependerá del valor del índice de masa corporal que presente el individuo.

Otro de los factores que se ha valorado en esta tesis ha sido la exposición al tabaco. En nuestro estudio, el tabaquismo aparece como un factor de riesgo cuando se valora su interacción con los genotipos o alelos correspondientes a los *loci CASP9*, *CASP7*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *BCL2*, *FAS* o *FASLG*. El consumo de tabaco es un hábito frecuente en las sociedades actuales, ocasionando el fallecimiento de más de 8 millones de personas al año (OMS). El tabaquismo no solo se ha vinculado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Phillips, 2002), sino también con, al menos, 17 tipos de cáncer en humanos (Alexandrov *et al*., 2016), entre ellos el de próstata (De Vita *et al*., 2008; Wein *et al*., 2008).

A continuación se presenta un caso que ejemplifica la influencia del tabaquismo en el riesgo diferencial de los individuos en función de la variabilidad alélica. En el *FASLG* (rs763110), cuando se analizan los datos globales se observan valores de OR de muy bajo impacto, no alcanzando la significación estadística. Así, al comparar el efecto del genotipo TT en relación a aquellos CC o CT se observa un OR de 1,15 y 1,16, respectivamente. Sin embargo, cuando se estratifica la muestra por tabaquismo, en los individuos consumidores de un número mayor o igual a 50 *pack-years* se desvelan valores de 9,38 (TT vs. CC), 15,00 (TT vs. CT) o 12,19 (TT vs. CC+CT), valores que son claramente significativos. Esto nos indica que el riesgo de un individuo portador del genotipo TT frente al desarrollo de PCa cuando es fumador se incrementa más de 12 veces en comparación con el atribuido a los sujetos que presentan al menos una copia del alelo protector C. En otras palabras, los individuos que carecen de la variante alélica C manifiestan una susceptibilidad a la enfermedad entre un 900% y un 1.500% superior que la de aquellos portadores de este alelo. Los resultados son especialmente llamativos habida cuenta de que casi el 22% de los varones en nuestra muestra poblacional consumen una cantidad muy alta de tabaco (py ≥50) y más del 13% son portadores del genotipo TT. En los análisis globales el comportamiento del marcador es neutro en referencia a la enfermedad, lo cual sucede porque existe una gran variedad de valores de consumo que enmascaran el efecto de la variabilidad genotípica. Este ejemplo pone de relieve la importancia de estratificar la muestra en función del consumo de tabaco.

Otros *loci* donde se ve claramente una interrelación entre el tabaquismo y la variabilidad alélica son el *CASP7* (rs11196418) o el *BCL2* (rs2279115). Así, los sujetos que son portadores del alelo de riesgo G para el *CASP7* y, que, además, son fumadores, manifiestan una susceptibilidad a desarrollar PCa 5 veces superior que la de aquellos que presentan ausencia de esta variante (OR= 5,61). En lo que se refiere al *BCL2*, se desvela un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad para los varones fumadores (py= 21-40,99) portadores del genotipo CC (OR= 6,70) o, en menor medida, del AA (OR= 4,73), en referencia a aquellos con el genotipo heterocigoto. Esto implicaría una susceptibilidad al PCa para los individuos fumadores carentes del genotipo heterocigoto entre un 400% y un 600% mayor.

El humo del cigarrillo contiene miles de compuestos químicos, muchos de los cuales presentan un efecto carcinogénico. Los efectos concretos de estos carcinógenos en las células tumorales no han sido establecidos, pero se han vinculado con un aumento en la proliferación celular, la migración, la invasión o la angiogénesis por medio de la activación de las vías celulares pro-supervivencia y la inhibición de la apoptosis (Sobus & Warren, 2014). Aunque

existen más de 60 carcinógenos en el tabaco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como el benzopireno, las N-nitrosaminas como la NNK (*nicotine-derived nitrosamine ketone*) o la NNN (*N-nitrosonornicotine*) así como las aminas aromáticas o los aldehídos, son los principales factores que determinan un aumento en el riesgo de cáncer asociado al tabaquismo (Hecht, 2003).

Los carcinógenos del tabaco ejercen un efecto genotóxico por medio de la formación de aductos en el ADN (Phillips & Venitt, 2012). La mayoría de estos compuestos necesitan una activación metabólica antes de ser capaces de reaccionar con el ADN, lo cual es catalizado principalmente por las enzimas P450 (Hecht, 2003). Este proceso permite transformar los carcinógenos en compuestos electrofílicos que pueden unirse covalentemente con el ADN, formando aductos (Hecht, 2006). La detoxificación metabólica, llevada a cabo por enzimas tipo glutatión-S-transferasa, permite la excreción de estos metabolitos carcinogénicos. El equilibrio entre la activación metabólica de los carcinógenos del tabaco y su detoxificación varía entre individuos y afecta a la suseptibilidad al cáncer (Hecht, 2006; Wu, Zhao, Suk & Christiani, 2004).

Por lo tanto, el principal vínculo entre el tabaquismo y el cáncer pasa por la acumulación de metabolitos carcinogénicos que forman aductos en el ADN (Hecht, 2006). En este punto, cobran importancia los sistemas de reparación celular, los cuales pueden eliminar estos aductos y devolver la estructura normal al ADN. Puesto que los carcinógenos del tabaco pueden causar distintos tipos de daño en el ADN, intervienen en su reparación tanto las vías MMR (*mismatch repair*), NER (*nucleotide excision repair*), BER (*base excision repair*) o DSB (*double strand repair*) (Hecht, 2006; Wu *et al*., 2004). Si estas enzimas no son capaces de reparar el daño al ADN, los aductos persisten, contribuyendo a una mayor probabilidad de desarrollar cáncer. Al mismo tiempo, la persistencia de estos aductos puede causar una codificación incorrecta durante el proceso de replicación por las enzimas ADN polimerasas, lo cual ocasiona mutaciones permanentes (Hecht, 2006). Si estas mutaciones ocurren en genes cruciales como los oncogenes *RAS* o *MYC* o en aquellos supresores tumorales como el *TP53*, se produce una pérdida del control del crecimiento celular normal, resultando en una inestabilidad genómica, una proliferación celular incontrolada y finalmente, el desarrollo de un cáncer (Hecht, 2003; Hecht, 2006). En este punto, la apoptosis juega un papel fundamental, en tanto que puede eliminar aquellas células con daños permanentes en el ADN, contrarrestando estos eventos mutacionales (Hetch, 2006).

Aunque la nicotina no es considerada un carcinógeno como tal, genera una adicción que condiciona a los individuos a una continua exposición a los carcinógenos del tabaco. Además, la nicotina puede unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina, permitiendo la activación de factores pro-supervivencia como las proteínas Akt o PKA, las cuales están involucradas en una disminución de la apoptosis así como en un aumento de la transformación tumoral y la angiogénesis (Hecht, 2003; Zeidler, Albermann & Lang, 2007).

El humo del cigarrillo es, además, una fuente de radicales libres como el óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno (ROS) y una mezcla de hidroquinonas, semiquinonas y quinonas. Todos estos factores generan un estrés oxidativo en las células (Hecht, 2006; Fearon *et al*., 2011; Kodama *et al*., 1997). Estos compuestos proporcionan un vínculo entre el tabaquismo y el cáncer, en tanto que presentan efectos genotóxicos induciendo distintos tipos de daño en el ADN como roturas o efectos epigenéticos (Kodama *et al*., 1997).

Por otra parte, el tabaquismo es una fuente de exposición a metales como el cadmio. El efecto carcinogénico del cadmio aparece relacionado con una inhibición de las vías de reparación del ADN, como la MMR, así como con una inducción de respuestas inflamatorias (Richter, Faaron & Pappas, 2017; Sahmoun, Case, Jackson & Schwartz, 2005). Se ha visto que el cadmio presenta actividades proliferativas en el tejido prostático (Sahmoun *et al*., 2005). El tabaquismo también se ha vinculado con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de próstata por asociarse con el aumento en las concentraciones de andrógenos circulantes, los cuales estimulan la proliferación de las células prostáticas (Dai, Gutai, Kuller, Cauley & MRFIT Research Group, 1988; De Vita *et al*., 2008; Wein *et al*., 2008).

Finalmente, la exposición al tabaco también contribuye a un debilitamiento del sistema inmune en los individuos, al inducir cambios estructurales y funcionales en las células de la defensa inmunitaria como los macrófagos, los neutrófilos, los linfocitos o las células *natural killer*. Estos efectos adversos en la vigilancia inmunitaria predispone a los individuos a una mayor probabilidad de enfermedades, tales como el cáncer (Mehta, Nazzal & Sadikot, 2008; Stämpfli & Anderson, 2009).

En definitiva, podemos considerar que el tabaquismo implica diferentes frentes (inmunológico, oligoelementos, disminución en la capacidad de reparación del ADN y, sobre todo, compuestos cancerígenos), que explican que se sea un factor de riesgo en la instauración del cáncer, dado que el carácter multifactorial converge independientemente y aditivamente en el riesgo a la tumorigénesis. El hecho de que uno de los efectos de los genes analizados en este estudio sea el de controlar los daños causados por el tabaco a nivel celular explicaría la interrelación observada entre su variabilidad genética, los niveles de consumo tabáquico y el desarrollo de PCa.

El tercer factor del entorno celular analizado en la tesis doctoral ha sido la edad de los individuos. Se ha visto una interrelación entre la edad y la variabilidad alélica de varios *loci* analizados en el estudio (*TP53*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1B*, *CASP9*, *CASP8*, *FAS*, *CDKN1A*) a la hora de desencadenar un carcinoma de próstata. Al igual que ocurría en el caso del tabaquismo y la obesidad/sobrepeso, la función de estos *loci* está estrechamente relacionada con el control de los daños celulares asociados a la edad, lo cual estaría en la base de la interrelación observada entre la variabilidad genética, la edad y la aparición del PCa.

Bien es sabido que el envejecimiento constituye el principal factor de riesgo frente al desarrollo del cáncer de próstata, en tanto que el 85% de los casos se diagnostican después de los 65 años (Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008). Cuando valoramos la influencia de la edad en el riesgo a desarrollar PCa observamos que el efecto diferencial de las variantes alélicas de varios *loci* sale a la luz en aquellos varones que presentan una edad avanzada.

Uno de los *loci* que mejor ejemplifica la interrelación entre el envejecimiento celular y el genoma es el *TP53* (rs1042522). En nuestra población el alelo C presenta un comportamiento de riesgo y el G protector. Al analizar los datos procedentes del estudio global de la muestra se observa un OR de 1,14 en la comparación CC vs. GG y un OR de 1,28 en la comparación CC vs. GC. El marcador presenta, por lo tanto, un comportamiento relativamente neutro en la muestra sin estratificar. No obstante, cuando se lleva a cabo la estratificación por edad se pone de manifiesto el efecto diferencial de las variantes, donde aquellos individuos con una edad avanzada (≥71 años) portadores del genotipo CC manifiestan un aumento muy notable en comparación con aquellos con al menos una copia del alelo G. Concretamente se observan *Odds Ratios* de 6,91 (CC vs. GG), de 8,13 (CC vs. GC) o de 7,30 (CC vs. GC+GG). Los resultados

de la estratificación por edad nos están indicando, por lo tanto, que en los varones de edad avanzada, la ausencia del alelo protector G implica un riesgo hasta 7 veces superior al PCa que siendo portador de este alelo, lo que supone un aumento del 700% en la susceptibilidad a la enfermedad. Más del 38% de la muestra poblacional presenta una edad igual o superior a los 71 años, por lo que esta diferencia en la susceptibilidad en función de las variantes genotípicas afectará a un elevado número de individuos. La ausencia de un análisis de estratificación por edad impediría desvelar el impacto real de este *loci* en el PCa, ya que en la muestra general se contemplan, no solo individuos de edad avanzada, sino también aquellos jóvenes o de mediana edad.

El envejecimiento se caracteriza por un declive progresivo en la función fisiológica, lo cual incrementa la incidencia del cáncer y otras enfermedades degenerativas (Zhang & Herman, 2002). La acumulación de mutaciones en el material genético de las células somáticas a lo largo de la vida resulta en una disminución de la función de los órganos (Kennedy, Loeb & Herr, 2012). Este incremento en la tasa de mutaciones es resultado de la exposición acumulativa a agentes genotóxicos así como de errores que ocurren durante los procesos de replicación del ADN (DePinho, 2000). La acumulación de daños en el ADN es el factor principal que liga el envejecimiento con el cáncer, especialmente si éstos ocurren en genes críticos del cáncer como supresores tumorales u oncogenes (Serrano & Blasco, 2007).

Por lo tanto, el mantenimiento de la estabilidad del genoma es de vital importancia en la prevención, tanto del envejecimiento como del cáncer. En este sentido, las células coordinan un mecanismo de respuesta al daño en el ADN (DDR), lo cual incluye a proteínas involucradas en diferentes vías metabólicas. Si el daño ocasionado no es elevado, la célula activa proteínas involucradas en la detención del ciclo celular y aquellas que permiten la reparación del ADN. Alternativamente, en caso de un daño severo e irreparable se puede promover la apoptosis, terminando con la muerte de la célula. Por su papel crucial en la respuesta al daño al ADN, destacan las proteínas de la familia p53 (Nicolai *et al*., 2015). Deficiencias en las proteínas involucradas en estos procesos puede acelerar el envejecimiento y predisponer a los individuos al desarrollo de un cáncer (Finkel, Serrano & Blasco, 2007).

Numerosas evidencias indican que el estrés oxidativo que se produce con el envejecimiento, debido a un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), es responsable de gran parte del daño al ADN, aumentando la probabilidad de cáncer (Kudryavsteva *et al*., 2016; Botswick *et al*., 2004; Wein *et al*., 2008). Los principales daños al genoma derivados del estrés oxidativo se refieren a roturas de hebra sencilla o doble, la creación de sitios apurínicos o apirimidínicos y la formación de aductos en el ADN. Estas modificaciones en la estructura del genoma crean un ambiente ideal para la mutagénesis y el inicio tumoral (Botswick *et al*., 2004). La mayoría de las células en los individuos jóvenes están equipadas con los mecanismos de defensa antioxidante adecuados, tales como la enzima superóxido dismutasa (SOD), la paraoxonasa (PON1) o la glutatión S-transferasa (GSTP1). No obstante, a medida que va avanzando la edad se observa un declive progresivo en la actividad de estas enzimas (Botswick, 2004). El estrés oxidativo que se produce con el envejecimiento de la próstata es considerado un importante factor de riesgo frente al desarrollo del PCa (Minelli, Bellezza, Conte & Culig, 2009).

A medida que se produce el envejecimiento también existe un aumento del número de células que experimenta el proceso de senescencia (Calcinotto *et al*., 2019). La senescencia es un proceso irreversible de detención del ciclo celular que se desencadena en respuesta al acortamiento de los telómeros así como a un daño al ADN, entre otros (Collado, Blasco &

Serrano, 2007). Aunque la senescencia se asocia típicamente con el envejecimiento, siendo responsable de muchos desórdenes relacionados con la edad avanzada, funciona como una potente barrera frente a la tumorigénesis al limitar la proliferación celular (Calcinotto *et al*., 2019). Otro mecanismo que contribuye al aumento en la incidencia del cáncer con la edad es el propio acortamiento de los telómeros, lo cual conduce a una inestabilidad genética que incrementa la probabilidad de sufrir mutaciones somáticas o reorganizaciones cromosómicas (Mathon & Lloyd, 2001).

Además, el deterioro del sistema inmune también contribuye al incremento en el riesgo de cáncer en personas de edad avanzada. Un declive en la función inmunitaria favorece el incremento del escape tumoral frente a la vigilancia llevada a cabo por células del sistema inmune (DePinho, 2000; Derhovanessian, Solana, Larbi & Pawelec, 2008). Otro de los factores que puede influenciar el incremento en la incidencia de los cánceres de tipo epitelial, como es el de próstata, son los cambios que se producen en las células del estroma. La acumulación de células estromales senescentes con el envejecimiento crean un microambiente en el tejido que es más permisivo para el crecimiento de células epiteliales transformadas oncogenéticamente (DePinho, 2000).

Independientemente de esta vía, al analizar la interacción de los distintos *loci* con la variable edad, se desvela que algunos de ellos presentan una relación con el inicio del cáncer de próstata precoz, esto es, con una formación del cáncer acelerada. En consecuencia, serán los individuos jóvenes portadores del genotipo/alelo de riesgo los que presenten la mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Detectar aquellos marcadores que están vinculados con un inicio temprano del cáncer es fundamental, ya que éstos suelen asociarse con una agresividad mayor, un peor pronóstico y una tasa de mortalidad más elevada (Salinas, Tsodilok, Ishak-Howard & Cooney, 2014). En nuestro estudio destacan como marcadores de inicio precoz el *locus MDM2* y el *CDKN1B*.

A modo de ejemplo se comenta el caso del *locus* CDKN1B (rs2066827). Cuando estratificamos la muestra por edad, en personas jóvenes (<57 años) se desvelan *Odds Ratios* de 6,46 en la comparación GG vs. TT, de 9,33 en la comparación GG vs. GT y de 7,64 en la GG vs. GT+TT, resultados que son claramente significativos. Estos valores apuntan a que los individuos jóvenes carentes del alelo T manifiestan un riesgo al PCa que es entre un 600% y un 900% superior que el de aquellos que llevan en el genoma esta variante. No obstante, en los varones con una edad superior a los 57 años el efecto del genotipo GG parece ser neutro, observándose valores cercanos a 1,00.

Por lo tanto, parece observarse que en la medida que aumenta el estrés celular inherente al envejecimiento, la presión ambiental parece atenuar las diferencias en la eficacia funcional de las variantes alélicas. De ahí que a partir de los 57 años no encontremos diferencias significativas entre las variantes G y T. Por el contrario, cuando el estrés celular no cobra particular relevancia es ahí cuando la diferencia de la eficacia funcional se manifiesta más claramente. Ello explicaría que es precisamente en edades relativamente tempranas donde encontramos la evidencia más notoria de las diferencias de la capacidad funcional de tales variantes alélicas.

En definitiva, y una vez más, debemos insistir en un aspecto central: el concepto de riesgo/protección inherente a la variabilidad del genoma humano puede tomar significados funcionales diferentes. Es precisamente la interacción genoma-entorno la que nos va a permitir valorar y entender biológicamente el significado del genoma de cada individuo. Y

consecuentemente este binomio genoma-entorno debe ser tenido en cuenta, de manera esencial, a la hora de utilizar la variabilidad genética como herramienta para evaluar el riesgo diferencial de los individuos a desarrollar cualquier tipo de enfermedad, y más concretamente, como en el caso que nos ocupa, el cáncer de prostata.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A continuación se exponen las principales conclusiones derivadas del presente estudio:

1. No existe evidencia estadística que se oponga a considerar que la población se halla en equilibrio genético para cada uno de los marcadores genético-moleculares analizados en este estudio. Se satisface así la exigencia previa que posibilita llevar a cabo los análisis de asociación genética con el riesgo a desarrollar cáncer de próstata.

2. El análisis global indica que los marcadores presentan, en general, baja penetrancia, con valores de *Odds Ratio* que oscilan entre 1,00 y 3,79. Es en los análisis de estratificación donde se manifiesta la susceptibilidad diferencial a padecer PCa.

3. La estratificación por tabaquismo conduce a valores de OR de alto impacto en algunos *loci*, destacando particularmente el *FASLG* (OR= 15,00), el *CASP7* (OR= 8,34) o el *BCL2* (OR= 6,70).

4. En la estratificación por índice de masa corporal (IMC), los valores más relevantes los proporcionan los *loci FAS* (OR= 10,00), *MDM2* (OR= 8,00) o *CASP3* (OR= 7,00).

5. Entre los valores de riesgo asociados a la edad destacan los correspondientes al *locus TP53*, alcanzándose un OR de 8,13 en los individuos mayores de 71 años, o el *locus BIRC5*, con un OR de 5,83 en mayores de 73 años. Por el contrario, el *CDKN1B* y el *MDM2* se definen como marcadores de riesgo a un desarrollo precoz de PCa, ya que en los individuos menores de 57 años se revelan valores de OR de 9,33 y 7,20, respectivamente.

6. De la batería total de marcadores, en seis de ellos, se analiza por primera vez la relación entre la variabilidad genética y la propensión a desarrollar PCa. Tales son los referidos a los *loci CASP3*, *CASP7*, *BIRC5*, *MDM2*, *CDKN1A* y *CDKN1B*. La variabilidad genética en el *locus FASLG* se examina por primera vez en su relación con el PCa en población de ancestralidad Caucasoide. Por la magnitud de su impacto merecen destacarse los *loci*:

   6a) *CASP7* y *FASLG* como marcadores asociados al consumo tabáquico.

   6b) *MDM2* asociado al índice de masa corporal.

7. Adicionalmente, se analiza por primera vez, no solo en PCa sino en cualquier tipo de cáncer, el impacto de la variabilidad genética del *locus FAS* (rs3740286). Los resultados obtenidos permiten identificar este SNP como un marcador asociado a la obesidad (IMC ≥33) que confiere valores de riesgo diferencial hasta 10 veces superior (AA vs. GG).

8. El análisis de asociación gen-gen pone de relieve valores de alto impacto entre varios marcadores, destacando la interacción entre los *loci CASP8-CASP3* (OR= 12,00), *BIRC5-CASP3* (OR= 10,50) o *CASP8-CASP9* (OR= 6,46).

9. La manifestación y objetivación del impacto de la variabilidad genética requiere la consideración de la interacción genotipo-ambiente. En la batería de todos los marcadores utilizados en este estudio, tal impacto se expresa en diferente medida según la naturaleza del binomio genotipo-ambiente. Al contrario de los valores resultantes del análisis general, el cual prescinde de tal interacción, son los análisis de estratificación los que nos permiten identificar y objetivar el impacto de los genotipos de riesgo/protección en segmentos poblacionales específicos, dado que esta estrategia se ajusta mejor a la realidad de la biología celular: el genoma interacciona con el entorno celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. REFERENCIAS.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, *9*(6), 400-414.

Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA repair*, *69*, 63-72.

Abukhdeir, A. M., & Park, B. H. (2008). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert reviews in molecular medicine*, *10*, e19.

Aceto, G. M., Awadelkarim, K. D., Di Nicola, M., Moscatello, C., Pantalone, M. R., Verginelli, F., ... & Mariani-Costantini, R. (2019). Germline TP53 mutation spectrum in Sudanese premenopausal breast cancer patients: correlations with reproductive factors. *Breast cancer research and treatment*, *175*(2), 479-485.

Afshari, Z. T., Nikpoor, A. R., Afshari, J. T., Ganjali, R., Atigh, P. S. G., Shandiz, F. H., & Jamialahmadi, K. (2017). Lack of an Association between a Functional Polymorphism in the MDM2 Promoter and Breast Cancer in Women in Northeast Iran. *Reports of biochemistry & molecular biology*, *6*(1), 112-117.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2016). *Biología molecular de la célula*. (6th ed.). Barcelona: Omega DL.

Alexandrov, L. B., Ju, Y. S., Haase, K., Van Loo, P., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., ... & Campbell, P. J. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*, *354*(6312), 618-622.

Ali, S. H. B., Bangash, K. S., Rauf, A., Younis, M., Anwar, K., Khurram, R., ... & Kiemeney, L. A. (2017). Identification of novel potential genetic predictors of urothelial bladder carcinoma susceptibility in Pakistani population. *Familial cancer*, *16*(4), 577-594.

Al-Khalaf, H. H., & Aboussekhra, A. (2013). Survivin expression increases during aging and enhances the resistance of aged human fibroblasts to genotoxic stress. *Age*, *35*(3), 549-562.

Al-Koofee, D. A. F., & Ismael, J. M. (2018). Genotyping of the BCL2 gene polymorphism rs2279115 shows associations with leukemia tendencies in the Iraqi population. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *12*(4), 1898-1904.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, *87*(2), 171.

Alsbeih, G. A., Al-Harbi, N. M., Bin Judia, S. S., Khoja, H. A., Shoukri, M. M., & Tulbah, A. M. (2017). Reduced rate of human papillomavirus infection and genetic overtransmission of TP53 72C polymorphic variant lower cervical cancer incidence. *Cancer*, *123*(13), 2459-2466.

Altieri, D. C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, *22*(53), 8581-8589.

Altieri, D. C. (2015). Survivin–the inconvenient IAP. *Seminars in cell & developmental biology*, *39*, 91-96.

Altiparmak, M. D., Bilgic, C. I., Dener, N. C., Gündüz, E., Yenidünya, S., Acar, M., ... & Gündüz, M. (2014). The effect of survivin gene promoter polymorphism on breast cancer. *Turkish Journal of Biology*, *38*(6), 858-866.

Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2010). The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*, *9*(45), 145-152.

American Cancer Society. (2020). American Cancer Society-Information and Resources about Prostate Cancer. Retrieved October 30, 2020, from http://www.cancer.org/

Aminimoghaddam, S., Shahrabi-Farahani, M., Mohajeri-Tehrani, M., Amiri, P., Fereidooni, F., Larijani, B., ... & Amoli, M. M. (2015). Epistatic interaction between adiponectin and survivin gene polymorphisms in endometrial carcinoma. *Pathology-Research and Practice*, *211*(4), 293-297.

Andric, M., Nikolic, N., Boskovic, M., Milicic, B., Skodric, S., Basta Jovanovic, G., & Milasin, J. (2012). Survivin gene promoter polymorphism-31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development. *European journal of oral sciences*, *120*(1), 9-13.

Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, *69*(1), 36-64.

Antonacopoulou, A. G., Floratou, K., Bravou, V., Kottorou, A., Dimitrakopoulos, F. I., Marousi, S., ... & Kalofonos, H. P. (2010). The survivin− 31 SNP in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Analytical Cellular Pathology*, *33*(5-6), 177-189.

Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N., & Lázaro-Masedo, S. (2016). Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Revista española de cardiología*, *69*(6), 579-587.

Ardlie, K. G., Kruglyak, L., & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, *3*(4), 299.

Asadi, M., Shanehbandi, D., Zarintan, A., Pedram, N., Baradaran, B., Zafari, V., ... & Hashemzadeh, S. (2017). TP53 gene Pro72Arg (rs1042522) single nucleotide polymorphism as not a risk factor for colorectal cancer in the Iranian Azari population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *18*(12), 3423-3427.

Asociación Española Contra el Cáncer: AECC (2020). Retrieved November 18, 2020, from https://www.aecc.es/es

Athanasoula, K. C., Gogas, H., Polonifi, K., Vaiopoulos, A. G., Polyzos, A., & Mantzourani, M. (2014). Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. *Cancer letters*, *347*(2), 175-182.

Attia, J., Thakkinstian, A., & D'Este, C. (2003). Meta-analyses of molecular association studies: Methodologic lessons for genetic epidemiology. *Journal of Clinical Epidemiology*, *56*(4), 297–303.

Avirmed, S., Wang, B. S., Selenge, B., Sanjaajamts, A., Ganbat, B., Erdenebileg, U., ... & Lee, Y. J. (2017). Association between MDM2-SNP309 and p53R72P polymorphisms and the risk of bladder cancer in the Mongolian population. *Molecular and clinical oncology*, *7*(3), 412-420.

Ayala, F. J., & Kiger, J. A. (1984). *Modern genetics*. (2nd ed.). California: Benjamin/Cummings.

Aydin, M., Bozkurt, A., Cikman, A., Gulhan, B., Karabakan, M., Gokce, A., ... & Kara, M. (2017). Lack of evidence of HPV etiology of prostate cancer following radical surgery and higher frequency of the Arg/Pro genotype in Turkish men with prostate cancer. *International brazilian journal of urology*, *43*(1), 36-46.

Aynaci, E., Coskunpinar, E., Eren, A., Kum, O., Oltulu, Y. M., Akkaya, N., ... & Yildiz, P. (2013). Association between survivin gene promoter-31G/C and -644C/T polymorphisms and non-small cell lung cancer. *Genetics and Molecular Research*, *12*(3), 3975-3982.

Ayoubi, S. E., Elkarroumi, M., El Khachibi, M., Idrissi, H. H., Ayoubi, H., Ennachit, S., ... & Nadifi, S. (2018). The 72Pro variant of the tumor protein 53 is associated with an increased breast cancer risk in the Moroccan population. *Pathobiology*, *85*(4), 247-253.

Azevedo, A. P., Silva, S. N., Reichert, A., Lima, F., Júnior, E., & Rueff, J. (2019). The role of caspase genes polymorphisms in genetic susceptibility to philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population. *Pathology & Oncology Research*, *25*(3), 961-969.

Bachmann, H. S., Heukamp, L. C., Schmitz, K. J., Hilburn, C. F., Kahl, P., Buettner, R., ... & Siffert, W. (2011). Regulatory BCL2 promoter polymorphism (− 938C> A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. *International journal of cancer*, *129*(10), 2390-2399.

Bai, L., & Zhu, W. G. (2006). p53: structure, function and therapeutic applications. *Journal of Cancer Molecules*, *2*(4), 141-153.

Barbieri, R. B., Bufalo, N. E., Secolin, R., Assumpcao, L. V. M., Maciel, R. M. D. B., Cerutti, J. M., & Ward, L. S. (2014). Polymorphisms of cell cycle control genes influence the development of sporadic medullary thyroid carcinoma. *European journal of endocrinology*, *171*(6), 761-767.

Barrdahl, M., Canzian, F., Joshi, A. D., Travis, R. C., Chang-Claude, J., Auer, P. L., ... & Haiman, C. A. (2014). Post-GWAS gene–environment interplay in breast cancer: results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium and a meta-analysis on 79 000 women. *Human molecular genetics*, *23*(19), 5260-5270.

Basabaeen, A. A. M., Abdelgader, E. A., Babekir, E. A., Abdelrahim, S. O., Eltayeb, N. H., Altayeb, O. A., ... & Ibrahim, I. K. (2019). TP53 gene 72 Arg/Pro (rs1042522) single nucleotide polymorphism contribute to increase the risk of B-chronic lymphocytic leukemia in the Sudanese population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *20*(5), 1579-1585.

Bayram, S., Akkız, H., Bekar, A., & Akgöllü, E. (2011). The association between the surviving −31G/C promoter polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in a Turkish population. *Cancer epidemiology*, *35*(6), 555-559.

Benedetti-Padrón, I. & Reyes, N. (2014). Atrofia inflamatoria proliferativa: potencial lesión precursora de adenocarcinoma prostático. *Revista ciencias biomédicas*, *5*(1):88-99.

Bergamaschi, D., Samuels, Y., Sullivan, A., Zvelebil, M., Breyssens, H., Bisso, A., ... & Crook, T. (2006). iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72–polymorphic p53. *Nature genetics*, *38*(10), 1133-1141.

Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*, *14*(2), 159-169.

Bethke, L., Sullivan, K., Webb, E., Murray, A., Schoemaker, M., Auvinen, A., ... & Muir, K. (2008). The common D302H variant of CASP8 is associated with risk of glioma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *17*(4), 987-989.

Bhushann Meka, P., Jarjapu, S., Vishwakarma, S. K., Nanchari, S. R., Cingeetham, A., Annamaneni, S., ... & Satti, V. (2016). Influence of BCL2-938 C> A promoter polymorphism and BCL2 gene expression on the progression of breast cancer. *Tumor Biology*, *37*(5), 6905-6912.

Bijl, M., Horst, G., Limburg, P. C., & Kallenberg, C. G. (2001). Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *European journal of clinical investigation*, *31*(6), 550-553.

Bilous, N., Abramenko, I., Saenko, V., Chumak, A., Dyagil, I., Martina, Z., & Kryachok, I. (2017). Clinical relevance of TP53 polymorphic genetic variations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, *58*, 1-8.

Blagosklonny, M. V. (2002). Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell cycle*, *1*(6), 391-393.

Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Wu, J. C., ... & Grütter, M. G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure*, *7*(9), 1125-1133.

Bloom, J., & Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in cancer biology*, *13*(1), 41-47.

Blundell, R. A. (2006). The biology of p21Waf1/Cip1-review paper. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *2*(1), 33-40.

Boidot, R., Végran, F., & Lizard-Nacol, S. (2014). Transcriptional regulation of the survivin gene. *Molecular biology reports*, *41*(1), 233-240.

Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., ... & Onel, K. (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, *119*(5), 591-602.

Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., ... & Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *101*(S10), 2371-2490.

Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, L., ... & Frebourg, T. (2006). Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *Journal of medical genetics*, *43*(6), 531-533.

Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *Journal of cell science*, *123*(19), 3209-3214.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *68*(6), 394-424.

Brüel, A., Christensen, E. I., Qvortrup, K., Tranum-Jensen, J., & Geneser, F. (2014). *Geneser Histología*. (4th ed.). México, DF: Médica Panamericana.

Budhram-Mahadeo, V., Morris, P. J., Smith, M. D., Midgley, C. A., Boxer, L. M., & Latchman, D. S. (1999). p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(21), 15237-15244.

Burns, T. F., & El-Deiry, W. S. (1999). The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular physiology*, *181*(2), 231-239.

Butt, S., Harlid, S., Borgquist, S., Ivarsson, M., Landberg, G., Dillner, J., ... & Manjer, J. (2012). Genetic predisposition, parity, age at first childbirth and risk for breast cancer. *BMC research notes*, *5*(1), 414.

Bye, H., Prescott, N. J., Matejcic, M., Rose, E., Lewis, C. M., Parker, M. I., & Mathew, C. G. (2011). Population-specific genetic associations with oesophageal squamous cell carcinoma in South Africa. *Carcinogenesis*, *32*(12), 1855-1861.

Cabanes A., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., Pollán, M., & López-Abente, G. (2009). La situación del cáncer en España, 1975–2006. Madrid: Instituto de Salud Carlos III.

Cai, J., Cai, Y., Ma, Q., Chang, F., Xu, L., Zhang, G., & Guo, X. (2017). Association of p53 codon 72 polymorphism with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population from northeast Sichuan. *Biomedical reports*, *6*(2), 217-222.

Cai, H., Xiang, Y. B., Qu, S., Long, J., Cai, Q., Gao, J., ... & Shu, X. O. (2011). Association of genetic polymorphisms in cell-cycle control genes and susceptibility to endometrial cancer among Chinese women. *American journal of epidemiology*, *173*(11), 1263-1271.

Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiological reviews*, *99*(2), 1047-1078.

Camplejohn, R. S., Hodgson, S., Carter, N., Kato, B. S., & Spector, T. D. (2006). Heritability of DNA-damage-induced apoptosis and its relationship with age in lymphocytes from female twins. *British journal of cancer*, *95*(4), 520-524.

Canova, C., Hashibe, M., Simonato, L., Nelis, M., Metspalu, A., Lagiou, P., ... & Richiardi, L. (2009). Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 European countries: the ARCAGE project. *Cancer research*, *69*(7), 2956-2965.

Cao, Y., Miao, X. P., Huang, M. Y., Deng, L., Lin, D. X., Zeng, Y. X., & Shao, J. Y. (2010). Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Molecular carcinogenesis*, *49*(11), 944-950.

Capasso, M., McDaniel, L. D., Cimmino, F., Cirino, A., Formicola, D., Russell, M. R., ... & Diskin, S. J. (2017). The functional variant rs34330 of CDKN1B is associated with risk of neuroblastoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, *21*(12), 3224-3230.

Cardeñosa, E. E., de Juan Jiménez, I., Suela, S. P., González, I. C., Huerta, Á. S., Beltran, A. S., ... & Gilabert, P. B. (2012). Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Familial cancer*, *11*(4), 629-636.

Catz, S. D., & Johnson, J. L. (2003). BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*, *8*(1), 29-37.

Cazzalini, O., Scovassi, A. I., Savio, M., Stivala, L. A., & Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *704*(1-3), 12-20.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Dataa, P., Alnemri, E. S., & Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, *104*(5), 769-780.

Chatterjee, K., Engelmark, M., Gyllensten, U., Dandara, C., van der Merwe, L., Galal, U., ... & Williamson, A. L. (2009). Fas and FasL gene polymorphisms are not associated with cervical cancer but differ among Black and Mixed-ancestry South Africans. *BMC research notes*, *2*(1), 238.

Chen, B., Wang, J., Wang, J., Zhang, J., Gu, X., & Feng, X. (2018). The Study of MDM2 rs937283 Variant and Cancer Susceptibility in a Central Chinese Population. *Technology in cancer research & treatment*, *17*, 1-7.

Chen, B., Wang, J., Chen, Y., Gu, X., & Feng, X. (2018). The MDM2 rs937283 A> G variant significantly increases the risk of lung and gastric cancer in Chinese population. *International journal of clinical oncology*, *23*(5), 867-876.

Chen, J., Amos, C. I., Merriman, K. W., Wei, Q., Sen, S., Killary, A. M., & Frazier, M. L. (2010). Genetic variants of p21 and p27 and pancreatic cancer risk in non-Hispanic Whites: a case-control study. *Pancreas*, *39*(1), 1-4.

Chen, J., Cui, X., Zhou, H., Qin, C., Cao, Q., Ju, X., ... & Wang, M. (2013). Functional promoter -31G/C variant of Survivin gene predict prostate cancer susceptibility among Chinese: a case control study. *BMC cancer*, *13*(1), 356.

Chen, K., Hu, Z., Wang, L. E., Sturgis, E. M., El-Naggar, A. K., Zhang, W., & Wei, Q. (2007). Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, *28*(9), 2008-2012.

Chen, K., Zhao, H., Hu, Z., Wang, L. E., Zhang, W., Sturgis, E. M., & Wei, Q. (2008). CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, *14*(19), 6343-6349.

Chen, X., Sturgis, E. M., Lei, D., Dahlstrom, K., Wei, Q., & Li, G. (2010). Human papillomavirus seropositivity synergizes with MDM2 variants to increase the risk of oral squamous cell carcinoma. *Cancer research*, *70*(18), 7199-7208.

Chen, X., Duan, N., Zhang, C., & Zhang, W. (2016). Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer*, *7*(3), 314.

Cheung, C. H., Cheng, L., Chang, K. Y., Chen, H. H., & Chang, J. Y. (2011). Investigations of survivin: the past, present and future. *Frontiers in Bioscience*, *16*(6), 952-961.

Chi, S. W. (2014). Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53. *BMB reports*, *47*(3), 167-172.

Chiou, S. K., Jones, M. K., & Tarnawski, A. S. (2003). Survivin-an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Medical Science Monitor*, *9*(4), PI25-PI29.

Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. K. (2008). Caspases—an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *151*(1), 10-27.

Chu, I. M., Hengst, L., & Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *8*(4), 253-267.

Church, D. N., & Talbot, D. C. (2012). Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Current oncology reports*, *14*(2), 120-128.

Cingeetham, A., Vuree, S., Dunna, N. R., Gorre, M., Nanchari, S. R., Edathara, P. M., ... & Satti, V. (2014). Association of caspase9 promoter polymorphisms with the susceptibility of AML in south Indian subjects. *Tumor Biology*, *35*(9), 8813-8822.

Cingeetham, A., Vuree, S., Dunna, N. R., Gorre, M., Nanchari, S. R., Edathara, P. M., ... & Satti, V. (2015). Influence of BCL2-938C> A and BAX-248G> A promoter polymorphisms in the development of AML: case–control study from South India. *Tumor Biology*, *36*(10), 7967-7976.

Clarke, G., Anderson, C., Pettersson, F., Cardon, L., Andrew, P., & Zondervan, K. (2011). Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nature Protocols*, *6*(2), 121–133.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, *326*(1), 1-16.

Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, *130*(2), 223-233.

Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2017). *La célula: una aproximación molecular*. (7th ed.). Madrid: Marbán.

Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in cell biology*, *13*(2), 65-70.

Cordon-Cardo, C., Koff, A., Drobnjak, M., Capodieci, P., Osman, I., Millard, S. S., ... & Scher, H. I. (1998). Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(17), 1284-1291.

Cortés-Funes, H. & Colomer-Bosch, R. (2010). *Tratado de oncología*. Barcelona: Permanyer.

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, *2*(9), 647-656.

Cory, S., Huang, D. C., & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, *22*(53), 8590-8607.

Cote, R. J., Shi, Y., Groshen, S., Feng, A. C., Skinner, D., Lieskovosky, G., & Cordon-Cardo, C. (1998). Association of p27Kipl levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(12), 916-920.

Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, *9*(7), 501-507.

Couch, F. J., Wang, X., McWilliams, R. R., Bamlet, W. R., De Andrade, M., & Petersen, G. M. (2009). Association of breast cancer susceptibility variants with risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *18*(11), 3044-3048.

Cox, A., Dunning, A. M., Garcia-Closas, M., Balasubramanian, S., Reed, M. W., Pooley, K. A., ... & Lissowska, J. (2007). A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics*, *39*(3), 352-358.

Crew, K. D., Gammon, M. D., Terry, M. B., Zhang, F. F., Agrawal, M., Eng, S. M., ... & Santella, R. M. (2007). Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, *28*(12), 2548-2551.

Curtin, J. F., & Cotter, T. G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*, *15*(11), 983-992.

da Rocha Boeira, T., Coser, J., Wolf, J. M., Cardinal, B. K. M., Grivicich, I., Simon, D., & Lunge, V. R. (2018). Polymorphism located in the upstream region of the RPS19 gene (rs2305809) is associated with cervical cancer: a case-control study. *Journal of cancer prevention*, *23*(3), 147-152.

Dai, H., Meng, X. W., & Kaufmann, S. H. (2016). BCL2 family, mitochondrial apoptosis, and beyond. *Cancer Translational Medicine*, *2*(1), 7-20.

Dai, W. S., Gutai, J. P., Kuller, L. H., Cauley, J. A., & MRFIT Research Group. (1988). Cigarette smoking and serum sex hormones in men. *American journal of epidemiology*, *128*(4), 796-805.

Dalamaga, M., Diakopoulos, K. N., & Mantzoros, C. S. (2012). The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocrine reviews*, *33*(4), 547-594.

Dalan, A. B., Timirci-Kahraman, O., Turan, S., Kafadar, A. M., Yaylim, I., Ergen, A., ... & Isbir, T. (2014). Association between FAS and FASL genetic variants and risk of primary brain tumor. *International Journal of Neuroscience*, *124*(6), 443-449.

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, *116*(2), 205-219.

Daripally, S., Nallapalle, S. R., Katta, S., & Prasad, V. V. (2015). Susceptibility to oral cancers with CD95 and CD95L promoter SNPs may vary with the site and gender. *Tumor Biology*, *36*(10), 7817-7830.

Dastmalchi, N., Safaralizadeh, R., Feizi, M. A. H., & Pouladi, N. (2017). The relationship of fas promoter polymorphisms and breast cancer risk in North-West of Iran: a haplotype and in silico analysis. *International Journal of Cancer Management*, *10*(9), e10528.

De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., … Nelson, W.G. (2007). Inflammation in prostate cancer carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *7*(4), 256-269.

de Oliveira Reis, A. H., de Carvalho, I. N. S. R., de Sousa Damasceno, P. B., Ferman, S. E., Lucena, E., Lopez-Camelo, J. S., ... & Vargas, F. R. (2012). Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma. *Pediatric blood & cancer*, *59*(1), 39-43.

Deeks, J. (1998). When can odds ratios mislead? Odds ratios should be used only in case-control studies and logistic regression analyses. *BMJ*, *317*(7166), 1155–1156.

Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, *22*(53), 8543-8567.

Deng, B., Liu, F., Luo, L., Wei, Y., Li, B., & Yang, H. (2016). CASP 3 genetic polymorphisms and risk of Hepatocellular carcinoma: a case-control study in a Chinese population. *Tumor Biology*, *37*(7), 8985-8991.

Deng, X. (2014). Bcl2 family functions as signaling target in nicotine-/NNK-induced survival of human lung cancer cells. *Scientifica*, *2014*, 215426.

Denmeade, S. R., Lin, X. S., & Isaacs, J. T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The Prostate*, *28*(4), 251-265.

DePinho, R. A. (2000). The age of cancer. *Nature*, *408*(6809), 248-254.

Derhovanessian, E., Solana, R., Larbi, A., & Pawelec, G. (2008). Immunity, ageing and cancer. *Immunity & Ageing*, *5*(1), 11.

Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A. M., ... & Tora, A. D. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, *21*(57), 8843-8851.

DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (2008). *Cancer, principles & practice of oncology* (7th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2001). Pten and p27 KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nature genetics*, *27*(2), 222-224.

DiPaola, R. S., Patel, J., & Rafi, M. M. (2001). Targeting apoptosis in prostate cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, *15*(3), 509-524.

Dorak, M. (2017). Genetic Epidemiology Glossary. Retrieved from http://www.dorak.info/epi/glosge.html

Driver, K. E., Song, H., Lesueur, F., Ahmed, S., Barbosa-Morais, N. L., Tyrer, J. P., ... & Dunning, A. M. (2008). Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population. *Carcinogenesis*, *29*(2), 333-341.

Dumont, P., Leu, J. J., Della Pietra, A. C., George, D. L., & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, *33*(3), 357-365.

Edathara, P. M., Gorre, M., Kagita, S., Vuree, S., Cingeetham, A., Nanchari, S. R., ... & Satti, V. (2016). Association of promoter polymorphisms of Fas–FasL genes with development of Chronic Myeloid Leukemia. *Tumor Biology*, *37*(4), 5475-5484.

El-Said, H., El-Hakim, T. A., Obada, M., El-Shafey, M., Hegazy, O., & El-Mageed, S. M. A. (2016). Study of survivin gene expression in hepatocellular carcinoma patients. *Menoufia Medical Journal*, *29*(4), 912.

Elsaid, A., Zahran, R., Elshazli, R., El-Sayed, A., Abou Samra, M., El-Tarapely, F., & Abdel-Malak, C. (2019). Genetic polymorphisms of TP53 Arg72Pro and Pro47Ser among Egyptian patients with colorectal carcinoma. *Archives of physiology and biochemistry*, *125*(3), 255-262.

Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell*, *44*(6), 817-829.

Enjuanes, A., Benavente, Y., Bosch, F., Martín-Guerrero, I., Colomer, D., Pérez-Álvarez, S., ... & Pujana, M. A. (2008). Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*, *68*(24), 10178-10186.

Eun, Y. G., Hong, I. K., Kim, S. K., Park, H. K., Kwon, S., Chung, D. H., & Kwon, K. H. (2011). A polymorphism (rs1801018, Thr7Thr) of BCL2 is associated with papillary thyroid cancer in Korean population. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, *4*(3), 149-154.

Eun, Y. G., Lee, Y. C., Kim, S. K., Chung, J. H., Kwon, K. H., & Park, I. S. (2015). Single nucleotide polymorphisms of the Fas gene are associated with papillary thyroid cancer. *Auris Nasus Larynx*, *42*(4), 326-331.

European Cancer Information System: ECIS. Retrieved January, 12, 2019 from https://ecis.jrc.ec.europa.eu/

Eymin, B., Haugg, M., Droin, N., Sordet, O., Dimanche-Boitrel, M. T., & Solary, E. (1999). p27 Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene*, *18*(7), 1411-1418.

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, *37*(11), 719-727.

Farre, L., Bittencourt, A. L., Silva-Santos, G., Almeida, A., Silva, A. C., Decanine, D., ... & Vandamme, A. M. (2008). Fas–670 promoter polymorphism is associated to susceptibility, clinical presentation, and survival in adult T cell leukemia. *Journal of leukocyte biology*, *83*(1), 220-222.

Fearon, I. M., Phillips, G., Carr, T., Taylor, M., Breheny, D., & P Faux, S. (2011). The role of oxidative stress in smoking-related diseases. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, *8*(4), 360-371.

Feng, Z., Hu, W., Teresky, A. K., Hernando, E., Cordon-Cardo, C., & Levine, A. J. (2007). Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(42), 16633-16638.

Feng, Z., Hu, W., Rajagopal, G., & Levine, A. J. (2008). The tumor suppressor p53: cancer and aging. *Cell Cycle*, *7*(7), 842-847.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., ... & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*, *103*, 356-387.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., & Alnemri, E. S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(49), 30761-30764.

Fernández-Mateos, J., Seijas-Tamayo, R., Adansa Klain, J. C., Pastor Borgoñón, M., Pérez-Ruiz, E., Mesía, R., ... & Fernández Ruiz, E. (2019). Genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma in a Spanish population. *Cancers*, *11*(4), 493.

Ferris-i-Tortajada, J., Garcia-i-Castell, J., Berbel-Tornero, O., & Ortega-Garcia, J. A. (2011). Constitutional risk factors in prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, *35*(5), 282-288.

Ferrís-i-Tortajada, J., Berbel-Tornero, O., Garcia-i-Castell, J., López-Andreu, J. A., Sobrino-Najul, E., & Ortega-García, J. A. (2011). Factores de riesgo ambientales no dietéticos en el cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, *35*(5), 289-295.

Figueiredo, J. C., Knight, J. A., Cho, S., Savas, S., Onay, U. V., Briollais, L., ... & Ozcelik, H. (2007). Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. *BMC cancer*, *7*(1), 99.

Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature*, *448*(7155), 767-774.

Finnon, P., Robertson, N., Dziwura, S., Raffy, C., Zhang, W., Ainsbury, L., ... & Bouffler, S. (2008). Evidence for significant heritability of apoptotic and cell cycle responses to ionising radiation. *Human genetics*, *123*(5), 485-493.

Fizazi, K., Martinez, L. A., Sikes, C. R., Johnston, D. A., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., ... & Troncoso, P. (2002). The association of p21 (WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research*, *8*(3), 775-781.

Francisco, G., Goncalves, F. T., Luiz, O. C., Saito, R. F., Toledo, R. A., Sekiya, T., ... & Festa-Neto, C. (2013). Polymorphisms in the p27kip-1 and prohibitin genes denote novel genes associated with melanoma risk in Brazil, a high ultraviolet index region. *Melanoma research*, *23*(3), 231-236.

Frank, B., Bermejo, J. L., Hemminki, K., Klaes, R., Bugert, P., Wappenschmidt, B., ... & Burwinkel, B. (2005). Re: Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *97*(13), 1012-1012.

Fu, W., Zhuo, Z. J., Jia, W., Zhu, J., Zhu, S. B., Lin, Z. F., ... & Liu, G. C. (2017). Association between TP53 gene Arg72Pro polymorphism and Wilms' tumor risk in a Chinese population. *OncoTargets and therapy*, *10*, 1149-1154.

Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, *384*(2), 201-232.

Fujikawa, K., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Yamanaka, T., Takase, K., & Nakano, T. (2000). Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer research*, *20*(3B), 1927-1932.

Fulda, S. (2009). Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer letters*, *281*(2), 128-133.

Furuya, Y., Fuse, H., & Masai, M. (2001). Serum soluble Fas level for detection and staging of prostate cancer. *Anticancer research*, *21*(5), 3595-3598.

Furuya, Y., Nagakawa, O., & Fuse, H. (2003). Prognostic significance of serum soluble Fas level and its change during regression and progression of advanced prostate cancer. *Endocrine journal*, *50*(5), 629-633.

Gangwar, R., & Mittal, R. D. (2010). Association of selected variants in genes involved in cell cycle and apoptosis with bladder cancer risk in North Indian population. *DNA and cell biology*, *29*(7), 349-356.

García-Closas, M., Jacobs, K., Kraft, P., & Chatterjee, N. (2011). Analysis of epidemiologic studies of genetic effects and gene-environment interactions. *IARC Sci Publ*, *163*, 281-301.

García-Foncillas, J. (2003). *Biología molecular en cáncer.* (1st ed.). Barcelona: Prous Science SA.

García-Porrero, J. A., & Hurié, J. M. (2005). *Anatomía humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Gartel, A. L., & Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molecular cancer therapeutics*, *1*(8), 639-649.

Gazouli, M., Tzanakis, N., Rallis, G., Theodoropoulos, G., Papaconstantinou, I., Kostakis, A., ... & Nikiteas, N. (2009). Survivin -31G/C promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*, *24*(2), 145-150.

Gemignani, F., Neri, M., Bottari, F., Barale, R., Canessa, P. A., Canzian, F., ... & Mencoboni, M. (2009). Risk of malignant pleural mesothelioma and polymorphisms in genes involved in the genome stability and xenobiotics metabolism. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *671*(1-2), 76-83.

George, G. P., Mandal, R. K., Kesarwani, P., Sankhwar, S. N., Mandhani, A., & Mittal, R. D. (2012). Polymorphisms and haplotypes in caspases 8 and 9 genes and risk for prostate cancer: a case-control study in cohort of North India. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *30*(6), 781-789.

Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., ... & Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of medical genetics*, *46*(8), 497-510.

Gleason, D. F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*, *23*(3), 273-279.

Gómez-Gómez, M., Danglot-Banck, C., Alvarado, SGH., García de la Torre, G. (2003). El estudio de casos y controles: su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica. *Revista mexicana de pediatría, 70(5)257-263.*

Goode, E. L., Fridley, B. L., Vierkant, R. A., Cunningham, J. M., Phelan, C. M., Anderson, S., ... & Hogdall, E. (2009). Candidate gene analysis using imputed genotypes: cell cycle single-nucleotide polymorphisms and ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *18*(3), 935-944.

Govindasamy, P., Sharchil, C., Mohan, N., Pandurangan, P., Tarigopula, A., Mani, R., & Samuel, C. R. (2018). TP53 gene alterations including codon 72 polymorphism in patients with multiple myeloma. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, *12*(2), 1-5.

Grignon, D. J. (2004). Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology*, *17*(3), 316-327.

Grochola, L. F., Zeron-Medina, J., Mériaux, S., & Bond, G. L. (2010). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a001032.

Gui, Y., Pan, Q., Chen, X., Xu, S., Luo, X., & Chen, L. (2017). The association between obesity related adipokines and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(43), 75389.

Guillem, V., Amat, P., Collado, M., Cervantes, F., Alvarez-Larrán, A., Martínez, J., ... & Hernández-Boluda, J. C. (2015). BCL2 gene polymorphisms and splicing variants in chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, *39*(11), 1278-1284.

Guo, G., Zhang, Q., Yu, Z., Li, J., Ding, Z., Li, J., & Tan, W. (2015). Correlation between survivin genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(6), 7426.

Guo, R., Ma, Y., Zhao, M., Zhang, W., An, G., Chen, B., ... & Li, Y. (2019). Polymorphism rs2395655 affects LEDGF/p75 binding activity and p21WAF1/CIP1 gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer medicine*, *8*(5), 2313-2324.

Gurumurthy S., Vasudevan, K. M., Rangnekar, V. K. (2001). Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer and metastasis reviews*, *20* (3-4), 225-243.

Han, Q. H., Shan, Z. J., Hu, J. T., Zhang, N., & Zhang, X. P. (2015). Relationship between gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *8*(7), 569-573.

Han, W., Zhou, Y., Zhong, R., Wu, C., Song, R., Liu, L., ... & Huang, L. (2013). Functional polymorphisms in FAS/FASL system increase the risk of neuroblastoma in Chinese population. *PloS one*, *8*(8), e71656.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.

Hao, W., Xu, X., Shi, H., Zhang, C., & Chen, X. (2018). No association of TP53 codon 72 and intron 3 16-bp duplication polymorphisms with breast cancer risk in Chinese Han women: new evidence from a population-based case–control investigation. *European journal of medical research*, *23*(1), 47.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis-the p53 network. *Journal of cell science*, *116*(20), 4077-4085.

Harris, M. H., & Thompson, C. B. (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death & Differentiation*, *7*(12), 1182-1191.

Hashemi, M., Fazaeli, A., Ghavami, S., Eskandari-Nasab, E., Arbabi, F., Mashhadi, M. A., ... & Łos, M. J. (2013). Functional polymorphisms of FAS and FASL gene and risk of breast cancer–pilot study of 134 cases. *Plos one*, *8*(1), e53075.

Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer discovery*, *5*(5), 475-487.

He, J., Wang, F., Zhu, J., Zhang, Z., Zou, Y., Zhang, R., ... & Xia, H. (2017). The TP53 gene rs1042522 C> G polymorphism and neuroblastoma risk in Chinese children. *Aging (Albany NY)*,*9*(3), 852-858.

Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*, *3*(10), 733-744.

Hecht, S. S. (2006). Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbeck's archives of surgery*, *391*(6), 603-613.

Henner, W. D., Evans, A. J., Hough, K. M., Harris, E. L., Lowe, B. A., & Beer, T. M. (2001). Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *The Prostate*, *49*(4), 263-266.

Herrera-Covarrubias, D., Coria-Avila, G. A., Fernández-Pomares, C., Aranda-Abreu, G. E., Manzo Denes, J., & Hernández, M. E. (2015). La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *32*(4), 766-776.

Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Haga, S., Kajiwara, T., & Emi, M. (2001). Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes and immunity*, *2*(2), 117-118.

Hirata, H., Hinoda, Y., Kikuno, N., Kawamoto, K., Dahiya, A. V., Suehiro, Y., ... & Dahiya, R. (2007). CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility. *Clinical Cancer Research*, *13*(17), 5056-5062.

Hirata, H., Hinoda, Y., Kikuno, N., Suehiro, Y., Shahryari, V., Ahmad, A. E., ... & Dahiya, R. (2009). Bcl2− 938C/A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *The Journal of urology*, *181*(4), 1907-1912.

Hofseth, L. J., Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends in pharmacological sciences*, *25*(4), 177-181.

Horita, N., & Kaneko, T. (2015). Genetic model selection for a case-control study and a meta-analysis. *Meta Gene*, *5*, 1–8.

Hosgood III, H. D., Baris, D., Zhang, Y., Zhu, Y., Zheng, T., Yeager, M., ... & Lan, Q. (2008). Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma. *Hematological oncology*, *26*(3), 148-151.

Hossain, A., Murshid, G. M. M., Zilani, M. N. H., Islam, F., Sultana, R., Sultana, T., ... & Rahman, M. M. (2017). TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk in Bangladeshi population. *Breast Cancer*, *24*(4), 571-578.

Hsing, A. W., & Chokkalingam, A. P. (2006). Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, *11*(5), 1388-413.

Hsieh, Y. S., Tsai, C. M., Yeh, C. B., Yang, S. F., Hsieh, Y. H., & Weng, C. J. (2012). Survivin T9809C, an SNP located in 3′-UTR, displays a correlation with the risk and clinicopathological development of hepatocellular carcinoma. *Annals of surgical oncology*, *19*(3), 625-633.

Hu, H. H., Zhou, S. F., Li, G. Q., Wu, Y. Y., Gao, W. H. (2007). Expression of caspase 7, caspase 3, survivin in breast neoplasm and their rellationship with clinicopathologic factors. *Journal of Modern Oncology, 15,* 640-642.

Hu, Z., Li, C., Chen, K., Wang, L. E., Sturgis, E. M., Spitz, M. R., & Wei, Q. (2008). Single nucleotide polymorphisms in selected apoptotic genes and BPDE-induced apoptotic capacity in apparently normal primary lymphocytes: a genotype-phenotype correlation analysis. *Journal of cancer epidemiology*, *2008*, 147905.

Huang, Q. R., Morris, D., & Manolios, N. (1997). Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Molecular immunology*, *34*(8-9), 577-582.

Huang, S. P., Wu, W. J., Chang, W. S. W., Wu, M. T., Chen, Y. Y., Chen, Y. J., ... & Huang, C. H. (2004). p53 Codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *13*(12), 2217-2224.

Huang, S. P., Yu, C. C., Liu, C. C., Wu, T. T., Huang, C. H., & Wu, M. T. (2008). CDKN1B V109G polymorphism frequency and prostate cancer risk in Taiwan. *Urologia internationalis*, *81*(1), 36-40.

Huang, Y., Deng, D., Li, H., Xiao, Q., Huang, L., Zhang, B., ... & Liu, Z. (2016). Fas-670A> G polymorphism is not associated with an increased risk of acute myeloid leukemia development. *Biomedical Reports*, *4*(2), 153-160.

Hnit, S. S. T., Xie, C., Yao, M., Holst, J., Bensoussan, A., De Souza, P., ... & Dong, Q. (2015). p27Kip1 signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *68*, 9-14.

Hyndman, M., Xu, J., Zheng, S., Isaacs, W., & Pavlovich, C. (2011). The Bcl-2-938 C genotype is more prevalent in patients with aggressive disease and a family history of prostate cancer. *The Journal of Urology*, *185*(4S), e482-e483.

le Sage, C., Nagel, R., & Agami, R. (2007). Diverse ways to control p27Kip1 function: miRNAs come into play. *Cell Cycle*, *6*(22), 2742-2749.

Imyanitov, E. N. (2009). Gene polymorphisms, apoptotic capacity and cancer risk. *Human genetics*, *125*(3), 239-246.

Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria, 19(4)*, 333-341.

International Agency for Research on Cancer: IARC. GLOBAL CANCER OBSERVATORY. Retrieved November, 18, 2020, from https://gco.iarc.fr/

Isakova, J., Talaibekova, E., Aldasheva, N., Vinnikov, D., & Aldashev, A. (2017). The association of polymorphic markers Arg399Gln of XRCC1 gene, Arg72Pro of TP53 gene and T309G of MDM2 gene with breast cancer in Kyrgyz females. *BMC cancer*, *17*(1), 758.

Isobe, N., Onodera, H., Mori, A., Shimada, Y., Yang, W., Yasuda, S., ... & Imamura, M. (2004). Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance. *Oncology*, *66*(3), 201-209.

Iwakuma, T., & Lozano, G. (2003). MDM2, an introduction. *Molecular Cancer Research*, *1*(14), 993-1000.

Jaiswal, P. K., Goel, A., Mandhani, A., & Mittal, R. D. (2012). Functional polymorphisms in promoter survivin gene and its association with susceptibility to bladder cancer in North Indian cohort. *Molecular biology reports*, *39*(5), 5615-5621.

Jagani, H., Kasinathan, N., Meka, S. R., & Josyula, V. R. (2016). Antiapoptotic Bcl-2 protein as a potential target for cancer therapy: A mini review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *44*(5), 1212-1221.

Jalali, S. A., Shandiz, F. H., Afshari, J. T., Ghochan, M. D. T., Nikpoor, A. R., & Mohammadi, M. (2018). Status of FAS and FAS ligand gene polymorphisms in patients with breast cancer in Northeastern Iran. *Reports of biochemistry & molecular biology*, *7*(1), 23-29.

Jang, J. S., Kim, K. M., Choi, J. E., Cha, S. I., Kim, C. H., Lee, W. K., ... & Park, J. Y. (2008). Identification of polymorphisms in the Caspase-3 gene and their association with lung cancer risk. *Molecular Carcinogenesis*, *47*(5), 383-390.

Jang, J. S., Kim, K. M., Kang, K. H., Choi, J. E., Lee, W. K., Kim, C. H., ... & Jung, T. H. (2008). Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung cancer*, *60*(1), 31-39.

Javid, J., Mir, R., Julka, P. K., Ray, P. C., & Saxena, A. (2015). Role of survivin re-expression in the development and progression of non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*, *36*(7), 5543-5550.

Javid, J., Mir, R., Mirza, M., Imtiyaz, A., Prasant, Y., Mariyam, Z., ... & Saxena, A. (2015). CC genotype of anti-apoptotic gene BCL-2 (− 938 C/A) is an independent prognostic marker of unfavorable clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, *17*(4), 289-295.

Jeong, B. S., Hu, W., Belyi, V., Rabadan, R., & Levine, A. J. (2010). Differential levels of transcription of p53-regulated genes by the arginine/proline polymorphism: p53 with arginine at codon 72 favors apoptosis. *The FASEB Journal*, *24*(5), 1347-1353.

Jiang, J., Ulbright, T. M., Zhang, S., Eckert, G. J., Kao, C., Gardner, T. A., ... & Cheng, L. (2002). Fas and Fas ligand expression is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *95*(2), 296-300.

Jiang, P., Zeng, X., Li, W., & Tang, J. (2012). Association of BCL2 promoter polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women. *Age*, *160(225)*, 0-13.

Jiao, Y., Jiang, Z., Wu, Y., Chen, X., Xiao, X., & Yu, H. (2016). A functional polymorphism (rs937283) in the MDM2 promoter region is associated with poor prognosis of retinoblastoma in Chinese Han population. *Scientific reports*, *6*(1), 1-11.

Jin, L., Xu, L., Song, X., Wei, Q., Sturgis, E. M., & Li, G. (2012). Genetic variation in MDM2 and p14 ARF and susceptibility to salivary gland carcinoma. *PloS one*, *7*(11).

Jin, Q., Menter, D. G., Mao, L., Hong, W. K., & Lee, H. Y. (2008). Survivin expression in normal human bronchial epithelial cells: an early and critical step in tumorigenesis induced by tobacco exposure. *Carcinogenesis*, *29*(8), 1614-1622.

Jin, Z., Gao, F., Flagg, T., & Deng, X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(38), 40209-40219.

Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, *4*(2), 147-171.

Johnson, M. E., & Howerth, E. W. (2004). Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Veterinary pathology*, *41*(6), 599-607.

Jung, Y. S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular signalling*, *22*(7), 1003-1012.

Kanemitsu, S., Ihara, K., Saifddin, A., Otsuka, T., Takeuchi, T., Nagayama, J., ... & Hara, T. (2002). A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, *29*(6), 1183-1188.

Kantari, C., & Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1813*(4), 558-563.

Karimi, M. Y., Kapoor, V., Sharma, S. C., & Das, S. N. (2013). Genetic polymorphisms in FAS (CD95) and FAS ligand (CD178) promoters and risk of tobacco-related oral carcinoma: gene–gene interactions in high-risk Indians. *Cancer investigation*, *31*(1), 1-6.

Karimian, M., Aftabi, Y., Mazoochi, T., Babaei, F., Khamechian, T., Boojari, H., & Nikzad, H. (2018). Survivin polymorphisms and susceptibility to prostate cancer: A genetic association study and an in silico analysis. *EXCLI journal*, *17*, 479-491.

Karp, G. (2006). Biología celular y molecular. (4th ed.). Conceptos y experimentos. México: McGraw-Hill Interamericana.

Kaufmann, T., Strasser, A., & Jost, P. J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation*, *19*(1), 42.

Kaur, S. (2014). A single nucleotide polymorphism in BCL-2 gene determines the risk of urinary bladder cancer. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *9*(5), 6-13.

Kawata, N., Tsuchiya, N., Horikawa, Y., Inoue, T., Tsuruta, H., Maita, S., ... & Habuchi, T. (2011). Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *International journal of cancer*, *129*(8), 1872-1880.

Kelesidis, I., Kelesidis, T., & Mantzoros, C. S. (2006). Adiponectin and cancer: a systematic review. *British journal of cancer*, *94*(9), 1221-1225.

Kennedy, S. R., Loeb, L. A., & Herr, A. J. (2012). Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mechanisms of ageing and development*, *133*(4), 118-126.

Keogh, R. H., & Cox, D. R. (2014). *Case-Control Studies*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, *26*(4), 239-257.

Khalifa, R. H., Bahgat, D. M. R., Darwish, H. A. H., & Shahin, R. M. H. (2016). Significant association between FasL gene-844T/C polymorphism and risk to hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Immunology letters*, *172*, 84-88.

Kibel, A. S., Suarez, B. K., Belani, J., Oh, J., Webster, R., Brophy-Ebbers, M., ... & Goodfellow, P. J. (2003). CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer research*, *63*(9), 2033-2036.

Kibel, A. S., Jin, C. H., Klim, A., Luly, J., A. Roehl, K., Wu, W. S., & Suarez, B. K. (2008). Association between polymorphisms in cell cycle genes and advanced prostate carcinoma. *The Prostate*, *68*(11), 1179-1186.

Kidd, L. R., Coulibaly, A., Templeton, T. M., Chen, W., Long, L. O., Mason, T., ... & Ahaghotu, C. (2006). Germline BCL-2 sequence variants and inherited predisposition to prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, *9*(3), 284-292.

Kim, H. J., Jin, X. M., Kim, H. N., Lee, I. K., Park, K. S., Park, M. R., ... & Choi, J. S. (2010). Fas and FasL polymorphisms are not associated with acute myeloid leukemia risk in Koreans. *DNA and cell biology*, *29*(10), 619-624.

Kirkin, V., Joos, S., & Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1644*(2-3), 229-249.

Knappskog, S., Trovik, J., Marcickiewicz, J., Tingulstad, S., Staff, A. C., Romundstad, P., ... & MoMaTEC study group. (2012). SNP285C modulates oestrogen receptor/Sp1 binding to the MDM2 promoter and reduces the risk of endometrial but not prostatic cancer. *European journal of cancer*, *48*(13), 1988-1996.

Knol, M. (2012). Down with odds ratios: risk ratios in cohort studies and randomised clinical trials. *Ned Tijdschr Geneeskd*, *156*(28), A4775.

Kodama, M., Kaneko, M., Aida, M., Inoue, F., Nakayama, T., & Akimoto, H. (1997). Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer research*, *17*(1A), 433-437.

Kostić, M., Nikolić, N., Ilić, B., Čarkić, J., Milenković, S., & Vukadinović, M. (2013). Analysis of polymorphism in the survivin gene promoter as a potential risk factor for head and neck cancers development. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, *141*(5-6), 304-307.

Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., & Reed, J. C. (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer research*, *57*(8), 1605-1613.

Krstic, J., Reinisch, I., Schupp, M., Schulz, T. J., & Prokesch, A. (2018). p53 functions in adipose tissue metabolism and homeostasis. *International journal of molecular sciences*, *19*(9), 2622.

Kruidering, M., & Evan, G. I. (2000). Caspase-8 in apoptosis: The beginning of "the end"?. *IUBMB life*, *50*(2), 85-90.

Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., ... & Moskalev, A. A. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, *7*(29), 44879.

Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., ... & Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c–mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, *94*(3), 325-337.

Kuida, K. (2000). Caspase-9. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *32*(2), 121-124.

Kumar, S. (1997). The apoptotic cysteine protease CPP32. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *29*(3), 393-396.

Kupcinskas, J., Wex, T., Bornschein, J., Selgrad, M., Leja, M., Juozaityte, E., ... & Malfertheiner, P. (2011). Lack of association between gene polymorphisms of Angiotensin converting enzyme, Nod-like receptor 1, Toll-like receptor 4, FAS/FASL and the presence of Helicobacter pylori-induced premalignant gastric lesions and gastric cancer in Caucasians. *BMC medical genetics*, *12*(1), 112.

Lai, H. C., Sytwu, H. K., Sun, C. A., Yu, M. H., Yu, C. P., Liu, H. S., ... & Chu, T. Y. (2003). Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *International journal of cancer*, *103*(2), 221-225.

Lai, H. C., Lin, W. Y., Lin, Y. W., Chang, C. C., Yu, M. H., Chen, C. C., & Chu, T. Y. (2005). Genetic polymorphisms of FAS and FASL (CD95/CD95L) genes in cervical carcinogenesis: an analysis of haplotype and gene–gene interaction. *Gynecologic oncology*, *99*(1), 113-118.

Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2010). Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *42*(1), 21-24.

Lan, Q., Zheng, T., Chanock, S., Zhang, Y., Shen, M., Wang, S. S., ... & Yeager, M. (2007). Genetic variants in caspase genes and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*, *28*(4), 823-827.

Landa, I., Montero-Conde, C., Malanga, D., De Gisi, S., Pita, G., Leandro-García, L. J., ... & Viglietto, G. (2010). Allelic variant at −79 (C> T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocrine-related cancer*, *17*(2), 317-328.

Landi, S., Gemignani, F., Canzian, F., Gaborieau, V., Barale, R., Landi, D., ... & Fabianova, E. (2006). DNA repair and cell cycle control genes and the risk of young-onset lung cancer. *Cancer research*, *66*(22), 11062-11069.

Latarjet, M., Liard, A., & Pró, E. (2004). *Anatomía humana.* (4th ed.). Madrid: Médica Panamericana.

Lavrik, I. N., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation*, *115*(10), 2665-2672.

Lavrik, I. N., & Krammer, P. H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death & Differentiation*, *19*(1), 36-41.

Lee, P. H., & Shatkay, H. (2007). F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic acids research*, *36*(suppl_1), D820-D824.

Lee, S. Y., Choi, Y. Y., Choi, J. E., Kim, M. J., Kim, J. S., Jung, D. K., ... & Cha, S. I. (2010). Polymorphisms in the caspase genes and the risk of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(8), 1152-1158.

Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, *9*(10), 749-758.

Lewis, C., & Knight, J. (2012). Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Briefings in Bioinformatics*, *3*(2), 146–153.

Li, C. C. (1976). *First course in population genetics.* (1st ed). California: Pacific Grove.

Li, C., Larson, D., Zhang, Z., Liu, Z., Strom, S. S., Gershenwald, J. E., ... & Cormier, J. N. (2006). Polymorphisms of the FAS and FAS ligand genes associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Pharmacogenetics and genomics*, *16*(4), 253-263.

Li, C., Wu, W., Liu, J., Qian, L., Li, A., Yang, K., ... & Zhang, Z. (2006). Functional polymorphisms in the promoter regions of the FAS and FAS ligand genes and risk of bladder cancer in south China: a case–control analysis. *Pharmacogenetics and genomics*, *16*(4), 245-251.

Li, C., Zhao, H., Hu, Z., Liu, Z., Wang, L. E., Gershenwald, J. E., ... & Wei, Q. (2008). Genetic variants and haplotypes of the caspase-8 and caspase-10 genes contribute to susceptibility to cutaneous melanoma. *Human mutation*, *29*(12), 1443-1451.

Li, C., Lu, J., Liu, Z., Wang, L. E., Zhao, H., El-Naggar, A. K., ... & Wei, Q. (2010). The six-nucleotide deletion/insertion variant in the CASP8 promoter region is inversely associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Prevention Research*, *3*(2), 246-253.

Li, F., & Altieri, D. C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochemical Journal*, *344*(2), 305-311.

Li, G., Sturgis, E. M., Wang, L. E., Chamberlain, R. M., Spitz, M. R., El-Naggar, A. K., ... & Wei, Q. (2004). Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *10*(12), 3996-4002.

Li, G., Zhai, X., Zhang, Z., Chamberlain, R. M., Spitz, M. R., & Wei, Q. (2006). MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case–control analysis. *Carcinogenesis*, *27*(10), 2028-2033.

Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, *27*(48), 6194-6206.

Li, J., Vervoorts, J., Carloni, P., Rossetti, G., & Lüscher, B. (2017). Structural prediction of the interaction of the tumor suppressor p27 KIP1 with cyclin A/CDK2 identifies a novel catalytically relevant determinant. *BMC bioinformatics*, *18*(1), 15-21.

Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., ... & Li, Q. (2017). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, *8*(14), 23996-24008.

Li, W., Qian, C., Wang, L., Teng, H., & Zhang, L. (2014). Association of BCL2-938C> A genetic polymorphism with glioma risk in Chinese Han population. *Tumor Biology*, *35*(3), 2259-2264.

Li, W., Wang, S. S., Deng, J., & Tang, J. X. (2017). Association of p73 gene G4C14-A4T14 polymorphism and MDM2 gene SNP309 with non-small cell lung cancer risk in a Chinese population. *Oncology letters*, *14*(2), 1817-1822.

Li, X. B., Li, S. N., Yang, Z. H., Cao, L., Duan, F. L., & Sun, X. W. (2013). Polymorphisms of survivin and its protein expression are associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese population. *DNA and cell biology*, *32*(5), 236-242.

Li, Y., Wang, J., Jiang, F., Lin, W., & Meng, W. (2012). Association of polymorphisms in survivin gene with the risk of hepatocellular carcinoma in Chinese han population: a case control study. *BMC medical genetics*, *13*(1), 1.

Li, Y., Hao, Y. L., Kang, S., Zhou, R. M., Wang, N., & Qi, B. L. (2013). Genetic polymorphisms in the Fas and FasL genes are associated with epithelial ovarian cancer risk and clinical outcomes. *Gynecologic oncology*, *128*(3), 584-589.

Li, Z., Zhang, Z., He, Z., Tang, W., Li, T., Zeng, Z., ... & Shi, Y. (2009). A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (http://analysis. bio-x. cn). *Cell research*, *19*(4), 519-523. Avaliable online at: http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php

Liarmakopoulos, E., Theodoropoulos, G., Vaiopoulou, A., Rizos, S., Aravantinos, G., Kouraklis, G., ... & Gazouli, M. (2013). Effects of stromal cell-derived factor-1 and survivin gene polymorphisms on gastric cancer risk. *Molecular medicine reports*, *7*(3), 887-892.

Lima, L., Morais, A., Lobo, F., Calais-da-Silva, F. M., Calais-da-Silva, F. E., & Medeiros, R. (2008). Association between FAS polymorphism and prostate cancer development. *Prostate cancer and prostatic diseases*, *11*(1), 94-98.

Lin, J., Zhang, Y., Wang, H., Chang, J., Wei, L., Cao, L., ... & Zhang, X. (2016). Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated gene CASP3 and the risk of lung cancer in Chinese population. *PloS One*, *11*(10), e0164358.

Lin, Y. C., Hour, T. C., Tsai, Y. C., Huang, S. P., Wu, W. J., Chen, C. H., ... & Huang, C. Y. (2017). Preliminary evidence of polymorphisms of cell cycle regulatory genes and their roles in urinary tract urothelial cancer susceptibility and prognosis in a Taiwan population. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *35*(9), 543.e7-543.e16.

Liedtke, C., Gröger, N., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2003). The human caspase-8 promoter sustains basal activity through SP1 and ETS-like transcription factors and can be up-regulated by a p53-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(30), 27593-27604.

Lippert, H. (2010). *Anatomía con orientación clínica para estudiantes*. Madrid: Marbán Libros SL.

Liu, F., Wei, Y. G., Luo, L. M., Wang, W. T., Yan, L. N., Wen, T. F., ... & Li, B. (2013). Genetic variants of p21 and p27 and hepatocellular cancer risk in a Chinese Han population: A case-control study. *International journal of cancer*, *132*(9), 2056-2064.

Liu, P., Zhuo, Z., Li, W., Cheng, J., Zhou, H., He, J., ... & Wang, J. (2019). TP53 rs1042522 C> G polymorphism and Wilms tumor susceptibility in Chinese children: a four-center case–control study. *Bioscience reports*, *39*(1).

Liu, Z., Sun, R., Lü, W., Dang, C., Song, Y., Wang, C., ... & Liu, J. (2012). The-938A/A genotype of BCL2 gene is associated with esophageal cancer. *Medical Oncology*, *29*(4), 2677-2683.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M., … Darnell, J. (2005). *Biología celular y molecular*. (5th ed.). Madrid: Médica Panamericana.

Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, L.J & Loscalzo, J. (2012). Harrison: principios de medicina interna. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

López-Abente, G., Núñez, O., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., & Pollán, M. (2015). La situación del cáncer en España: Informe 2015. Madrid: Instituto de Salud Carlos III.

López Fontana, C. M., Maselli Artola, M. E., Milta Mónaco, N. D., Recalde Rincón, G. M., Vanrell Rodriguez, M. C., Uvilla Recupero, A., ... & López Laur, J. D. (2009). Influencia de la leptina y la adiponectina sobre el cáncer de próstata. *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, *62*(2), 103-108.

Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, *21*(3), 485-495.

Lu, X., & Lane, D. P. (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or lonizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes?. *Cell*, *75*(4), 765-778.

Lu, Y., Liu, Y., Zeng, J., He, Y., Peng, Q., Deng, Y., ... & Li, S. (2014). Association of p53 codon 72 polymorphism with prostate cancer: an update meta-analysis. *Tumor Biology*, *35*(5), 3997-4005.

Lubahn, J., Berndt, S. I., Jin, C. H., Klim, A., Luly, J., Wu, W. S., ... & Hayes, R. B. (2010). Association of CASP8 D302H polymorphism with reduced risk of aggressive prostate carcinoma. *The Prostate*, *70*(6), 646-653.

Luque, J., & Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingenería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. (1st ed.). Madrid: Harcourt.

Lüthi, A. U., & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, *14*(4), 641-650.

Ma, F., Zhang, H., Zhai, Y., Huang, W., Zhao, C., Ou, S., ... & Yue, W. (2011). Functional polymorphism-31C/G in the promoter of BIRC5 gene and risk of nasopharyngeal carcinoma among chinese. *PLoS One*, *6*(2), e16748.

Ma, H., Jin, G., Hu, Z., Zhai, X., Chen, W., Wang, S., ... & Wang, X. (2006). Variant genotypes of CDKN1A and CDKN1B are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women. *International journal of cancer*, *119*(9), 2173-2178.

Macri, E., & Loda, M. (1998). Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *17*(4), 337-344.

MacPherson, G., Healey, C. S., Teare, M. D., Balasubramanian, S. P., Reed, M. W., Pharoah, P. D., ... & Cox, A. (2004). Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *Journal of the national cancer institute*, *96*(24), 1866-1869.

Mai, H., May, W. S., Gao, F., Jin, Z., & Deng, X. (2003). A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1886-1891.

Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Tatusova, T. (2010). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic acids research*, *39*(suppl_1), D52-D57. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

Maher, S., Toomey, D., Condron, C., & Bouchier-Hayes, D. (2002). Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunology and cell biology*, *80*(2), 131-137.

Mandal, R. K., & Mittal, R. D. (2012). Are cell cycle and apoptosis genes associated with prostate cancer risk in North Indian population? *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *30*(5), 555-561.

Marques, I., Teixeira, A. L., Ferreira, M., Assis, J., Lobo, F., Mauricio, J., & Medeiros, R. (2013). Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population. *Molecular biology reports*, *40*(8), 4819-4826.

Martinez, L. A., Yang, J., Vazquez, E. S., del Carmen Rodriguez-Vargas, M., Olive, M., Hsieh, J. T., ... & Navone, N. M. (2002). p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, *23*(8), 1289-1296.

Maruei-Milan, R., Heidari, Z., & Salimi, S. (2019). Role of MDM2 309T> G (rs2279744) and I/D (rs3730485) polymorphisms and haplotypes in risk of papillary thyroid carcinoma, tumor stage, tumor size, and early onset of tumor: a case control study. *Journal of cellular physiology*, *234*(8), 12934-12940.

Mathon, N. F., & Lloyd, A. C. (2001). Cell senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *1*(3), 203-213.

Mayora, A., & Arvelo, F. (2011). Cáncer de próstata y apoptosis. *Investigación Clínica*, *52*(4), 376-396.

McEleny, K. R., Watson, R. W. G., Coffey, R. N., O'Neill, A. J., & Fitzpatrick, J. M. (2002). Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *The Prostate*, *51*(2), 133-140.

Meek, D. W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature Reviews Cancer*, *9*(10), 714-723.

Mehta, H., Nazzal, K., & Sadikot, R. T. (2008). Cigarette smoking and innate immunity. *Inflammation Research*, *57*(11), 497-503.

Meyer, A., Coinac, I., Bogdanova, N., Dubrowinskaja, N., Turmanov, N., Haubold, S., ... & Machtens, S. (2013). Apoptosis gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a hospital-based study of German patients treated with brachytherapy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *31*(1), 74-81.

Miedl, H., Lebhard, J., Ehart, L., & Schreiber, M. (2019). Association of the MDM2 SNP285 and SNP309 genetic variants with the risk, age at onset and prognosis of breast cancer in Central European women: a hospital-based case-control study. *International journal of molecular sciences*, *20*(3), 509.

Miller, S. A. & Dykes, D. P. H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, *16*(3), 55404.

Minelli, A., Bellezza, I., Conte, C., & Culig, Z. (2009). Oxidative stress-related aging: a role for prostate cancer? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1795*(2), 83-91.

Mirzayans, R., Andrais, B., Kumar, P., & Murray, D. (2016). The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: caspase 3 mediates cell death or survival? *International journal of molecular sciences*, *17*(5), 708.

Mistry, T., Digby, J. E., Desai, K. M., & Randeva, H. S. (2007). Obesity and prostate cancer: a role for adipokines. *European urology*, *52*(1), 46-53.

Mittal, R. D., George, G. P., Mishra, J., Mittal, T., & Kapoor, R. (2011). Role of functional polymorphisms of P53 and P73 genes with the risk of prostate cancer in a case-control study from Northern India. *Archives of medical research*, *42*(2), 122-127.

Mittal, R. D., Mittal, T., Singh, A. K., & Mandal, R. K. (2012). Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population. *DNA and cell biology*, *31*(1), 67-73.

Mohamed, F. Z., Hussien, Y. M., AlBakry, M. M., Mohamed, R. H., & Said, N. M. (2013). Role of DNA repair and cell cycle control genes in ovarian cancer susceptibility. *Molecular biology reports*, *40*(5), 3757-3768.

Mohammadpour-Gharehbagh, A., Salimi, S., Keshavarzi, F., Zakerian, S., Sajadian, M., & Mokhtari, M. (2016). Association of FAS A-670G polymorphism and risk of uterine leiomyoma in a Southeast Iranian population. *Reports of biochemistry & molecular biology*, *5*(1), 51-55.

Moore, S. C., Leitzmann, M. F., Albanes, D., Weinstein, S. J., Snyder, K., Virtamo, J., ... & Gunter, M. J. (2009). Adipokine genes and prostate cancer risk. *International journal of cancer*, *124*(4), 869-876.

Moradinasab, M., Ostovar, A., Nabipour, I., Eghbali, S. S., Vahdat, K., Ghaderi, A., ... & Ravanbod, M. R. (2017). TP53 codon 72 genetic polymorphism, rs1042522, modifies the association between tobacco smoking and breast cancer risk. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *19*(10), e58027.

Mou, X., Li, T., Wang, J., Ali, Z., Zhang, Y., Chen, Z., ... & He, N. (2015). Genetic variation of BCL2 (rs2279115), NEIL2 (rs804270), LTA (rs909253), PSCA (rs2294008) and PLCE1 (rs3765524, rs10509670) genes and their correlation to gastric cancer risk based on universal tagged arrays and Fe3O4 magnetic nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*, *11*(11), 2057-2066.

Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J. C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E., & Reisdorf, P. (2000). Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(6), 3867-3872.

Müschen, M., Warskulat, U., & Beckmann, M. W. (2000). Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *Journal of molecular medicine*, *78*(6), 312-325.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, *88*(3), 355-365.

Nagata, S., & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, *267*(5203), 1449-1456.

Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annual review of genetics*, *33*(1), 29-55.

Nallapalle, S. R., Daripally, S., & Prasad, V. S. V. (2015). Promoter polymorphism of FASL confers protection against female-specific cancers and those of FAS impact the cancers divergently. *Tumor Biology*, *36*(4), 2709-2724.

National Cancer Institute. (n.d.). Definition of pack year - NCI Dictionary of Cancer Terms. Retrieved July 9, 2019, from https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/pack-year

Nei, M., & Roychoudhury, A. (1974). Sampling Variances of Heterozygosity and. *Genetics*, *76*, 379–390.

Nelson, W. G., Carter, H. B., DeWeese, T. L., Antonarakis, E. S., & Einsenberg, M. A. Prostate cancer. *Abeloff's Clinical Oncology*, *fifth edition*, 1463-1496.e9.

Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., ... & Munday, N. A. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, *376*(6535), 37-43.

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, *6*(11), 1028-1042.

Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., & Raschellà, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY)*, *7*(12), 1050-1065.

Nückel, H., Frey, U. H., Bau, M., Sellmann, L., Stanelle, J., Dürig, J., ... & Siffert, W. (2007). Association of a novel regulatory polymorphism (− 938C> A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *109*(1), 290-297.

O'Brien, D. I., Nally, K., Kelly, R. G., O'Connor, T. M., Shanahan, F., & O'Connell, J. (2005). Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, *9*(5), 1031-1044.

O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., & Shanahan, F. (1999). The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunology today*, *20*(1), 46-52.

Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., del Mistro, G., van Den Boom, D., & Jurinke, C. (2005). iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY ® System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. *Sequenom*, (8876–006), 1–12.

Ogino, S., Shima, K., Nosho, K., Irahara, N., Baba, Y., Wolpin, B. M., ... & Fuchs, C. S. (2009). A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *18*(6), 1849-1858.

Oliveira, C., Lourenço, G. J., Rinck-Junior, J. A., Cintra, M. L., Moraes, A. M., & Lima, C. S. P. (2014). Association between genetic polymorphisms in apoptosis-related genes and risk of cutaneous melanoma in women and men. *Journal of dermatological science*, *74*(2), 135-141.

Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., & de Murcia, G. (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *American journal of human genetics*, *64*(5), 1282-1288.

Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2011). Caspases and cancer. *Cell death and differentiation*, *18*(9), 1441-1449.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Retrieved November 26, 2020, from https://www.who.int/tobacco/es/

Organización Mundial de la Salud (OMS). Retrieved December 11, 2020, from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

Organización Mundiald de la Salud (OMS). Retrieved December 11, 2020, from https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/

Orlinick, J. R., Vaishnaw, A. K., & Elkon, K. B. (1999). Structure and function of Fas/Fas ligand. *International reviews of immunology*, *18*(4), 293-308.

Ortiz, J. S. (2006). *Cáncer: del gen al sentido de la vida*. Madrid: EGRAF, SA.

Ottini, L., Silvestri, V., Saieva, C., Rizzolo, P., Zanna, I., Falchetti, M., ... & Manoukian, S. (2013). Association of low-penetrance alleles with male breast cancer risk and clinicopathological characteristics: results from a multicenter study in Italy. *Breast cancer research and treatment*, *138*(3), 861-868.

Owen-Schaub, L., Chan, H., Cusack, J. C., Roth, J., & Hill, L. L. (2000). Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. *International journal of oncology*, *17*(1), 5-17.

Ozdogan, S., Kafadar, A., Yilmaz, S. G., Timirci-Kahraman, O., Gormus, U., & Isbir, T. (2017). Role of caspase-9 gene Ex5+ 32 G> A (rs1052576) variant in susceptibility to primary brain tumors. *Anticancer research*, *37*(9), 4997-5000.

Palmerini, F., Devilard, E., Jarry, A., Birg, F., & Xerri, L. (2001). Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. *Human pathology*, *32*(5), 461-467.

Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clínica*, *124*(10), 388-395.

Pan, W., Yang, J., Wei, J., Chen, H., Ge, Y., Zhang, J., ... & Yang, M. (2015). Functional BCL-2 regulatory genetic variants contribute to susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, *5*(1), 1-8.

Paniagua, R. (1997). *Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales*. (2nd ed.). Madrid: McGrawHill Interamericana.

Park, B. L., Kim, L. H., Cheong, H. S., Cho, H. Y., Kim, E. M., Shin, H. D., ... & Lee, C. (2004). Identification of variants in cyclin D1 (CCND1) and B-Cell CLL/lymphoma 2 (BCL2). *Journal of human genetics*, *49*(8), 449-454.

Park, H. L., Ziogas, A., Chang, J., Desai, B., Bessonova, L., Garner, C., ... & Clague, J. (2016). Novel polymorphisms in caspase-8 are associated with breast cancer risk in the California Teachers Study. *BMC cancer*, *16*(1), 14.

Park, J. Y., Park, J. M., Jang, J. S., Choi, J. E., Kim, K. M., Cha, S. I., ... & Park, R. W. (2006). Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Human molecular genetics*, *15*(12), 1963-1971.

Park, S. H., Choi, J. E., Kim, E. J., Jang, J. S., Lee, W. K., Cha, S. I., ... & Kim, Y. C. (2006). Polymorphisms in the FAS and FASL genes and risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*, *54*(3), 303-308.

Pavlidou, E., Daponte, A., Egea, R., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G. M., Barbadilla, A., & Agorastos, T. (2016). Genetic polymorphisms of FAS and EVER genes in a Greek population and their susceptibility to cervical cancer: A case control study. *BMC cancer*, *16*(1), 923.

Pérez, L. O., Barbisan, G., DiFranza, L., Contreras, A., & Golijow, C. D. (2011). Fas and Fas Ligand polymorphisms in human cancer: their effect in cervical cancer. *Current Topics in Genetics*.

Peter, M. E., & Krammer, P. H. (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, *10*(1), 26-35.

Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., & Ceppi, P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell death & differentiation*, *22*(4), 549-559.

Picazo, M. L. (1996). Formas especiales de carcinoma de próstata. *Patologia*, *29*(2), 153-157.

Piedrola Gil, G. (2002). *Medicina preventiva y salud pública*. (10th ed.). Barcelona: Masson.

Pim, D., & Banks, L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International journal of cancer*, *108*(2), 196-199.

Pinti, M., Troiano, L., Nasi, M., Moretti, L., Monterastelli, E., Mazzacani, A., ... & Salvioli, G. (2002). Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. *Cell Death & Differentiation*, *9*(4), 431-438.

Pittman, A. M., Broderick, P., Sullivan, K., Fielding, S., Webb, E., Penegar, S., ... & Houlston, R. S. (2008). CASP8 variants D302H and −652 6N ins/del do not influence the risk of colorectal cancer in the United Kingdom population. *British journal of cancer*, *98*(8), 1434-1436.

Persad, R., Liu, C., Wu, T. T., Houlihan, P. S., Hamilton, S. R., Diehl, A. M., & Rashid, A. (2004). Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Modern Pathology*, *17*(7), 861.

Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1644*(2-3), 83-94.

Phillips, D. H. (2002). Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*, *23*(12), 1979-2004.

Phillips, D. H., & Venitt, S. (2012). DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *International journal of cancer*, *131*(12), 2733-2753.

Pouladi, N., HosseinpourFeizi, M. A., Kouhsari, S. M., Farajzadeh, D., Khani, H., Gavgani, R. R., ... & Arghavanian, Y. (2018). Molecular epidemiology of breast cancer among Iranian-Azeri population based on p53 research. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, *25*(3), 228-242.

Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death & differentiation*, *6*(2), 99-104.

Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., & Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1813*(1), 238-259.

Prignot, J. (1987). Quantification and chemical markers of tobacco-exposure. *European Journal of Respiratory Diseases*, *70*(1), 1–7.

QIAGEN. (2020). QIAGEN-GeneGlobe Pathways. Retrieved from https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze/

Qin, C., Cao, Q., Li, P., Ju, X., Wang, M., Chen, J., ... & Lu, Q. (2012). Functional promoter -31G> C variant in survivin gene is associated with risk and progression of renal cell cancer in a Chinese population. *PLoS One*, *7*(1), e28829.

Qin, L., & Yu, T. (2015). Association between rs9904341 G< C gene polymorphism and susceptibility to pancreatic cancer in a Chinese population. *Genetics and Molecular Research*, *14*(2), 5197-5202.

Quaye, L., Tyrer, J., Ramus, S. J., Song, H., Wozniak, E., DiCioccio, R. A., ... & Goode, E. L. (2009). Association between common germline genetic variation in 94 candidate genes or regions and risks of invasive epithelial ovarian cancer. *PloS one*, *4*(6), e5983.

Quiñones, L. A., Irarrázabal, C. E., Rojas, C. R., Orellana, C. E., Acevedo, C., Huidobro, C., ... & Cáceres, D. D. (2006). Joint effect among p53, CYP1A1, GSTM1 polymorphism combinations and smoking on prostate cancer risk: an exploratory genotype-environment interaction study. *Asian journal of andrology*, *8*(3), 349-355.

Qiu, X. G., Chen, Y. D., Yuan, J., Zhang, N., Lei, T., Liu, J., & Yang, M. (2019). Functional BCL-2 rs2279115 promoter noncoding variant contributes to glioma predisposition, especially in males. *DNA and cell biology*, *38*(1), 85-90.

Qureshi, A., Nan, H., Dyer, M., & Han, J. (2010). Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes and risk of skin cancer. *Journal of dermatological science*, *58*(1), 78-80.

Radojevic-Skodric, S., Basta-Jovanovic, G., Brasanac, D., Nikolic, N., Bogdanovic, L., Milicic, B., & Milasin, J. (2012). Survivin gene promoter −31 G/C Polymorphism is associated with Wilms tumor susceptibility in Serbian children. *Journal of pediatric hematology/oncology*, *34*(8), e310-e314.

Rai, R., Sharma, K. L., Sharma, S., Misra, S., Kumar, A., & Mittal, B. (2014). Death receptor (DR4) haplotypes are associated with increased susceptibility of gallbladder carcinoma in north Indian population. *PloS one*, *9*(2), e90264.

Rajaraman, P., Wang, S. S., Rothman, N., Brown, M. M., Black, P. M., Fine, H. A., ... & Inskip, P. D. (2007). Polymorphisms in apoptosis and cell cycle control genes and risk of brain tumors in adults. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *16*(8), 1655-1661.

Ramus, S. J., Vierkant, R. A., Johnatty, S. E., Pike, M. C., Van Den Berg, D. J., Wu, A. H., ... & DiCioccio, R. A. (2008). Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer.*International journal of cancer*, *123*(2), 380-388.

Rasool, I., Wani, K. A., Yousuf, A., Bhat, I. A., Rah, B., Nazir, S. U., ... & Dubey, S. (2018). Role of the functional polymorphism of survivin gene (-31G/C) and risk of breast cancer in a North Indian population. *Clinical Breast Cancer*, *18*(4), e671-e676.

Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., & Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(25), 14250-14255.

Richter, P., Faroon, O., & Pappas, R. S. (2017). Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities. *International journal of environmental research and public health*, *14*(10), 1154.

Ricks-Santi, L., Mason, T., Apprey, V., Ahaghotu, C., McLauchlin, A., Josey, D., ... & Dunston, G. M. (2010). p53 Pro72Arg polymorphism and prostate cancer in men of African descent. *The Prostate*, *70*(16), 1739-1745.

Rivu, S. F., Apu, M. N. H., Shabnaz, S., Nahid, N. A., Islam, M. R., Al-Mamun, M. M. A., ... & Hasnat, A. (2017). Association of TP53 codon 72 and CDH1 genetic polymorphisms with colorectal cancer risk in Bangladeshi population. *Cancer epidemiology*, *49*, 46-52.

Robertson, J. D., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2000). Nuclear events in apoptosis. *Journal of structural biology*, *129*(2-3), 346-358.

Rogler, A., Rogenhofer, M., Borchardt, A., Lunz, J. C., Knoell, A., Hofstaedter, F., ... & Stoehr, R. (2011). P53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism and prostate cancer risk: association between disease onset and proline genotype. *Pathobiology*, *78*(4), 193-200.

Rokhlin, O. W., Bishop, G. A., Hostager, B. S., Waldschmidt, T. J., Sidorenko, S. P., Pavloff, N., ... & Cohen, M. B. (1997). Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines.*Cancer research*, *57*(9), 1758-1768.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histología: texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular.* (7th ed.). Barcelona: Wolters Kluwer.

Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M., & Henderson, B. (1986). Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of the National Cancer Institute*, *76*(1), 45-48.

Ross, R. K., Bernstein, L., Pike, M. C., Henderson, B. E., Lobo, R. A., Stanczyk, F. Z., & Shimizu, H. (1992). 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *The Lancet*, *339*(8798), 887-889.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., ... & Thornberry, N. A. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature structural biology*, *3*(7), 619-625.

Sackett, D., Deeks, J., & Atman, D. (1996). Down with Odds Ratios! *Evidence-Based Medicine*, *1*(6), 8–10.

Sah, N. K., Khan, Z., Khan, G. J., & Bisen, P. S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer letters*, *244*(2), 164-171.

Saha, T., Kar, R. K., & Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: a review of experimental and theoretical evidence. *Progress in biophysics and molecular biology*, *117*(2-3), 250-263.

Sahmoun, A. E., Case, L. D., Jackson, S. A., & Schwartz, G. G. (2005). Cadmium and prostate cancer: a critical epidemiologic analysis. *Cancer investigation*, *23*(3), 256-263.

Salinas, C. A., Tsodikov, A., Ishak-Howard, M., & Cooney, K. A. (2014). Prostate cancer in young men: an important clinical entity. *Nature Reviews Urology*, *11*(6), 317.

Salvesen, G. S., & Walsh, C. M. (2014). Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. *Seminars in immunology*, *26*(3), 246-252.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanofi-Aventis. (2011). *Understanding the prostate. Anatomy, physiology & pathology. Flash Cards.* USA: Scientific Publishing Ltd.

Savas, S., Ahmad, M. F., Shariff, M., Kim, D. Y., & Ozcelik, H. (2005). Candidate nsSNPs that can affect the functions and interactions of cell cycle proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *58*(3), 697-705.

Savitskaya, M. A., & Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, *80*(11), 1393-1405.

Sehgal, L., Mathur, R., Braun, F. K., Wise, J. F., Berkova, Z., Neelapu, S., ... & Samaniego, F. (2014). FAS-antisense 1 lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma. *Leukemia*, *28*(12), 2376-2387.

Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, *8*(9), 715-722.

Serrano, S. G. (2003). Patologías de la próstata. *Farmacia profesional*, *17*(1), 38-44.

Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B., & Weinstein, I. B. (2000). Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. *Journal of cellular physiology*, *183*(1), 18-27.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, *22*(4), 526-539.

Shamloo, B., & Usluer, S. (2019). p21 in Cancer Research. *Cancers*, *11*(8), 1178.

Shao, P., Ding, Q., Qin, C., Wang, M., Tang, J., Zhu, J., ... & Zhang, Z. (2011). Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FAS ligand and risk of prostate cancer in a Chinese population. *The Prostate*, *71*(10), 1122-1130.

Shariat, S. F., Lotan, Y., Saboorian, H., Khoddami, S. M., Roehrborn, C. G., Slawin, K. M., & Ashfaq, R. (2004). Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer*, *100*(4), 751-757.

Sharma, K., Wang, R. X., Zhang, L. Y., Yin, D. L., Luo, X. Y., Solomon, J. C., ... & Shi, Y. F. (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology & therapeutics*, *88*(3), 333-347.

Sharpe, C. R., & Siemiatycki, J. (2001). Joint effects of smoking and body mass index on prostate cancer risk. *Epidemiology*, 546-551.

Shephard, N. D., Abo, R., Rigas, S. H., Frank, B., Lin, W. Y., Brock, I. W., ... & Meindl, A. (2009). A breast cancer risk haplotype in the caspase-8 gene. *Cancer research*, *69*(7), 2724-2728.

Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, *29*(1), 308-311. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, *9*(3), 459-470.

Shi, Y.Y., He, L. (2005). SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, 15(2):97-98. Retrieved from http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php

Shin, S., Sung, B-J., Cho, Y. S., Kim, H. J., Ha, N. C., Hwang, J. I. et al. (2001). An anti-apoptotic protein human surviving is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, *40*, 1117-1123.

Sibley, K., Rollinson, S., Allan, J. M., Smith, A. G., Law, G. R., Roddam, P. L., ... & Morgan, G. J. (2003). Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer research*, *63*(15), 4327-4330.

Sivoňová, M. K., Vilčková, M., Kliment, J., Mahmood, S., Jurečeková, J., Dušenková, S., ... & Dobrota, D. (2015). Association of p53 and p21 polymorphisms with prostate cancer. *Biomedical reports*, *3*(5), 707-714.

Škereňová, M., Halašová, E., Matakova, T., Jesenská, Ľ., Jurečeková, J., Šarlinová, M., ... & Dobrota, D. (2017). Low variability and stable frequency of common haplotypes of the TP53 gene region in colorectal cancer patients in a Slovak population. *Anticancer research*, *37*(4), 1901-1907.

Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry*, *276*(10), 7320-7326.

Sobus, S. L., & Warren, G. W. (2014). The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. *Cancer*, *120*(23), 3617-3626.

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España. 2018.

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Retrieved from https://www.seedo.es/

Sokal, R., & Rohlf, F. J. (1969). *The Principles and Practice os Statistics in Biological Research*. (1st ed). San Francisco: F. W. and Company.

Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of assocation studies. *Bioinformatics, 22(15),1928-1929.* Retrieved from https://www.snpstats.net/start.htm

Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, J. H., ... & Nam, S. W. (2003). Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene*, *22*(39), 8048-8052.

Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, S. Y., Park, W. S., Nam, S. W., Lee, J. Y., ... & Lee, S. H. (2004). Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Human genetics*, *115*(2), 112-115.

Sousa, E. A., Sabell, S. F., & Grupo de Estudio Breogan. (2006). In reference to the article" Epidemiological situation of prostate cancer in Spain. *Actas urologicas espanolas*, *30*(8), 843.

Srivastava, K., Srivastava, A., & Mittal, B. (2010). Caspase-8 polymorphisms and risk of gallbladder cancer in a Northern Indian population. *Molecular carcinogenesis*, *49*(7), 684-692.

Stämpfli, M. R., & Anderson, G. P. (2009). How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature Reviews Immunology*, *9*(5), 377-384.

Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1387 (1-2), 17-31.

Stoehr, R., Hitzenbichler, F., Kneitz, B., Hammerschmied, C. G., Burger, M., Tannapfel, A., & Hartmann, A. (2008). Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics. *British journal of cancer*, *99*(1), 78-82.

Stupack, D. G. (2013). Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer letters*, *332*(2), 133-140.

Sucheston, L., Witonsky, D. B., Hastings, D., Yildiz, O., Clark, V. J., Di Rienzo, A., & Onel, K. (2011). Natural selection and functional genetic variation in the p53 pathway. *Human molecular genetics*, *20*(8), 1502-1508.

Suela, S. P., Cardenosa, E. E., González, E. B., de Juan Jiménez, I., González, I. C., Huerta, A. S., ... & Gilabert, P. B. (2010). CASP8 D302H polymorphism delays the age of onset of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Breast cancer research and treatment*, *119*(1), 87-93.

Sun, T., Lee, G. S. M., Oh, W. K., Pomerantz, M., Yang, M., Xie, W., ... & Kantoff, P. W. (2010). Single-nucleotide polymorphisms in p53 pathway and aggressiveness of prostate cancer in a Caucasian population. *Clinical Cancer Research*, *16*(21), 5244-5251.

Suzuki, N., Wakisaka, S., Takeba, Y., Mihara, S., & Sakane, T. (1999). Effects of cigarette smoking on Fas/Fas ligand expression of human lymphocytes. *Cellular immunology*, *192*(1), 48-53.

Suzuki, K., Matsui, H., Ohtake, N., Nakata, S., Takei, T., Nakazato, H., ... & Kurokawa, K. (2003). A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese. *Journal of biomedical science*, *10*(4), 430-435.

Tan, S. C., Ismail, M. P., Duski, D. R., Othman, N. H., & Ankathil, R. (2017). FAS c.-671A> G polymorphism and cervical cancer risk: a case–control study and meta-analysis. *Cancer genetics*, *211*, 18-25.

Tas, A., Atabey, M., Caglayan, G., Bostanci, M. E., Sahin Bolukbasi, S., Topcu, O., & Silig, Y. (2017). Investigation of the association between the MDM2 T309G polymorphism and gastric cancer. *Biomedical Reports*, *7*(5), 469-473.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., ... & Dixit, V. M. (1995). Yama/CPP32β, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell*, *81*(5), 801-809.

The 1000 Genomes Project Consortium. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68-74. Retrieved from https://www.internationalgenome.org/

Theodoropoulos, G. E., Michalopoulos, N. V., Panoussopoulos, S. G., Taka, S., & Gazouli, M. (2010). Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics. *Pancreas*, *39*(7), 976-980.

Thomas, G. V., Schrage, M. I., Rosenfelt, L., Kim, J. H., Salur, G., DeKernion, J. B., ... & Reiter, R. E. (2000). Preoperative prostate needle biopsy p27 correlates with subsequent radical prostatectomy p27, Gleason grade and pathological stage. *The Journal of urology*, *164*(6), 1987-1991.

Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., & Matlashewski, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology*, *19*(2), 1092-1100.

Timmer, J. C., & Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell death and differentiation*, *14*(1), 66-72.

Timmer, T., de Vries, E. G., & de Jong, S. (2002). Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, *196*(2), 125-134.

Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, *144*(8), 1382-1398.

Toledo, F., & Wahl, G. M. (2007). MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *39*(7-8), 1476-1482.

Tomoda, K., Kubota, Y., & Kato, J. Y. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27 Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, *398*(6723), 160-165.

Tong, N., Zhang, L., Sheng, X., Wang, M., Zhang, Z., Fang, Y., ... & Zhang, Z. (2012). Functional polymorphisms in FAS, FASL and CASP 8 genes and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a case–control study. *Leukemia & lymphoma*, *53*(7), 1360-1366.

Trama, A., Foschi, R., Larrañaga, N., Sant, M., Fuentes-Raspall, R., Serraino, D., ... & Zielonke, N. (2015). Survival of male genital cancers (prostate, testis and penis) in Europe 1999–2007: Results from the EUROCARE-5 study. *European Journal of Cancer*, *51*(15), 2206-2216.

Tummers, B., & Green, D. R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunological reviews*, *277*(1), 76-89.

Ulybina, Y. M., Kuligina, E. S., Mitiushkina, N. V., Rozanov, M. E., Ivantsov, A. O., Ponomariova, D. N., ... & Devilee, P. (2009). Coding polymorphisms in Casp5, Casp8 and DR4 genes may play a role in predisposition to lung cancer. *Cancer letters*, *278*(2), 183-191.

Upadhyay, R., Khurana, R., Kumar, S., Ghoshal, U. C., & Mittal, B. (2011). Role of survivin gene promoter polymorphism (− 31G> C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in northern India. *Annals of surgical oncology*, *18*(3), 880-887.

Vahednia, E., Shandiz, F. H., Bagherabad, M. B., Moezzi, A., Afzaljavan, F., Tajbakhsh, A., ... & Pasdar, A. (2019). The impact of CASP8 rs10931936 and rs1045485 polymorphisms as well as the haplotypes on breast cancer risk: a case-control study. *Clinical breast cancer*, *19*(5), e563-e577.

van Raam, B. J., & Salvesen, G. S. (2012). Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8: hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1824*(1), 113-122.

Varmazyar, S., Marashi, S. M., Shoja, Z., Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M., Shahmahmoodi, S., ... & Jalilvand, S. (2017). MDM2 gene polymorphisms and risk of classic Kaposi's sarcoma among Iranian patients. *Medical microbiology and immunology*, *206*(2), 157-163.

Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, *335*(6189), 440-442.

Velapasamy, S., Alex, L., Chahil, J. K., Lye, S. H., Munretnam, K., Nor Hashim, N. A., ... & Ler, L. W. (2013). Influences of Multiple Genetic Polymorphisms on Ovarian Cancer Risk in Malaysia. *Genetic testing and molecular biomarkers*, *17*(1), 62-68.

Verdecia, M. A., Huang, H. K., Dutil, E., Kaiser, D. A., Hunter, T., & Noel, J. P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature structural biology*, *7*(7), 602-608.

Vervoorts, J., & Lüscher, B. (2008). Post-translational regulation of the tumor suppressor p27 KIP1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(20), 3255-3264.

Villa-Morales, M., & Fernández-Piqueras, J. (2012). Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, *16*(1), 85-101.

Villamizar, O., Chambers, C. B., Riberdy, J. M., Persons, D. A., & Wilber, A. (2016). Long noncoding RNA Saf and splicing factor 45 increase soluble Fas and resistance to apoptosis.*Oncotarget*, *7*(12), 13810-13826.

Vineis, P. (1997). Molecular epidemiology: low-dose carcinogens and genetic susceptibility. *International journal of cancer*, *71*(1), 1-3.

Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(2), 615–619.

Waligórska-Stachura, J., Jankowska, A., Waśko, R., Liebert, W., Biczysko, M., Czarnywojtek, A., ... & Ruchała, M. (2012). Survivin–prognostic tumor biomarker in human neoplasms–review. *Ginekologia polska*, *83*(7), 537-540.

Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(35), 12815-12819.

Wander, S. A., Zhao, D., & Slingerland, J. M. (2011). p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clinical cancer research*, *17*(1), 12-18.

Wang, H., & Ma, K. (2015). Association between MDM2 rs769412 and rs937283 polymorphisms with alcohol drinking and laryngeal carcinoma risk. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(6), 7436-7440.

Wang, W., Spitz, M. R., Yang, H., Lu, C., Stewart, D. J., & Wu, X. (2007). Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. *Clinical cancer research*, *13*(19), 5974-5981.

Wang, J. X., & Zheng, S. (2004). Caspase-3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis. *Chinese medical journal*, *117*(12), 1821-1824.

Wang, K., Liu, B., Li, J., Xiong, G., Guan, X., Yang, K., & Bai, Y. (2014). Association between SNPs in P53 binding regions and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *The International Journal of Biological Markers*, *29*(2), 160-168.

Wang, L. E., Cheng, L., Spitz, M. R., & Wei, Q. (2003). Fas A670G polymorphism, apoptotic capacity in lymphocyte cultures, and risk of lung cancer. *Lung Cancer*, *42*(1), 1-8.

Wang, L. H., Ting, S. C., Chen, C. H., Tsai, C. C., Lung, O., Liu, T. C., ... & Lin, Y. C. (2010). Polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and risk of oral cancer and malignant potential of oral premalignant lesions in a Taiwanese population. *Journal of oral pathology & medicine*, *39*(2), 155-161.

Wang, M., Zhang, Z., Zhu, H., Fu, G., Wang, S., Wu, D., ... & Zhang, Z. (2008). A novel functional polymorphism C1797G in the MDM2 promoter is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population. *Clinical cancer research*, *14*(11), 3633-3640.

Wang, M., Wang, Z., Wang, X. J., Jin, T. B., Dai, Z. M., Kang, H. F., ... & Dai, Z. J. (2016). Distinct role of the Fas rs1800682 and FasL rs763110 polymorphisms in determining the risk of breast cancer among Han Chinese females. *Drug design, development and therapy*, *10*, 2359-2367.

Wang, N., Wang, S., Zhang, Q., Lu, Y., Wei, H., Li, W., ... & Ou, Y. (2012). Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC cancer*, *12*(1), 589-594.

Wang, N., Li, Y., Zhou, R. M., Cui, S. J., Cao, S. R., Huang, X., ... & Shan, B. E. (2019). The effect of polymorphisms in the promoter of the BIRC5 gene on the risk of oesophageal squamous cell carcinoma and patient's outcomes. *Mutagenesis*, *34*(4), 307-313.

Wang, S., Wu, S., Meng, Q., Li, X., Zhang, J., Chen, R., & Wang, M. (2016). FAS rs2234767 and rs1800682 polymorphisms jointly contributed to risk of colorectal cancer by affecting SP1/STAT1 complex recruitment to chromatin. *Scientific reports*, *6*(1), 1-8.

Wang, W., Zheng, Z., Yu, W., Lin, H., Cui, B., & Cao, F. (2012). Polymorphisms of the FAS and FASL genes and risk of breast cancer. *Oncology letters*, *3*(3), 625-628.

Wang, W. L., Tao, Y. P., Han, X. L., Li, X., Zi, Y. M., Yang, C., & Li, J. D. (2014). Role of polymorphisms in BCL-2 and BAX genes in modulating the risk of developing non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, *55*(7), 1602-1608.

Wang, X., Zelenski, N. G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1996). Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *The EMBO journal*, *15*(5), 1012-1020.

Wang, Y. H., Chiou, H. Y., Lin, C. T., Hsieh, H. Y., Wu, C. C., Hsu, C. D., & Shen, C. H. (2009). Association between survivin gene promoter −31 C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population. *Urology*, *73*(3), 670-674.

Wang, Y. X., Zhao, L., Wang, X. Y., Liu, C. M., & Yu, S. G. (2012). Role of Caspase 8, Caspase 9 and Bcl-2 polymorphisms in papillary thyroid carcinoma risk in Han Chinese population. *Medical Oncology*, *29*(4), 2445-2451.

Waring, P., & Müllbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and cell biology*, *77*(4), 312-317.

Waterhouse, N., Kumar, S., Song, Q., Strike, P., Sparrow, L., Dreyfuss, G., ... & Watters, D. (1996). Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of

interleukin 1β-converting enzyme-like proteases in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 29335-29341.

Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Novick, A. C., Partin, A. W., & Peters, C. A. (2008). *Campbell-Walsh Urología.* (9th ed.). Buenos Aires: Médica-Panamericana.

Weng, C. J., Hsieh, Y. H., Chen, M. K., Tsai, C. M., Lin, C. W., & Yang, S. F. (2012). Survivin SNP-carcinogen interactions in oral cancer. *Journal of dental research*, *91*(4), 358-363.

World Health Organization. (2004). *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. WHO press.

Winter, R. N., Kramer, A., Borkowski, A., & Kyprianou, N. (2001). Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer research*, *61*(3), 1227-1232.

Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *30*(1), 87.

Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kägi, D., ... & Senaldi, G. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & development*, *12*(6), 806-819.

Wu, C. C., & Bratton, S. B. (2017). Caspase-9 swings both ways in the apoptosome. *Molecular & cellular oncology*, *4*(2), e1281865.

Wu, H. C., Chang, C. H., Chen, H. Y., Tsai, F. J., Tsai, J. J., & Chen, W. C. (2004). p53 gene codon 72 polymorphism but not tumor necrosis factor-α gene is associated with prostate cancer. *Urologia internationalis*, *73*(1), 41-46.

Wu, J., Metz, C., Xu, X., Abe, R., Gibson, A. W., Edberg, J. C., ... & Kimberly, R. P. (2003). A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein β element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *The Journal of Immunology*, *170*(1), 132-138.

Wu, S., Wang, S., Fu, Y., Tang, W., Jin, H., Meng, Q., ... & Zhang, Z. (2017). A novel mechanism of rs763110 polymorphism contributing to cervical cancer risk by affecting the binding affinity of C/EBPβ and OCT1 complex to chromatin. *International journal of cancer*, *140*(4), 756-763.

Wu, X., Zhao, H., Suk, R., & Christiani, D. C. (2004). Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*, *23*(38), 6500-6523.

Wu, X., Gu, J., Grossman, H. B., Amos, C. I., Etzel, C., Huang, M., ... & Spitz, M. R. (2006). Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle–control genes. *The American Journal of Human Genetics*, *78*(3), 464-479.

Würstle, M. L., Laussmann, M. A., & Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental cell research*, *318*(11), 1213-1220.

Xiao, F. K., Guo, S., Yang, F., Zhao, L. S., & Wang, L. D. (2019). MDM2 and its functional polymorphism SNP309 contribute to the development of esophageal carcinoma. *The journal of gene medicine*, *21*(5), e3086.

Xu, B., Xu, Z., Cheng, G., Min, Z. C., Mi, Y., Zhang, Z. Z., ... & Zhang, Z. D. (2010). Association between polymorphisms of TP53 and MDM2 and prostate cancer risk in southern Chinese. *Cancer genetics and cytogenetics*, *202*(2), 76-81.

Xu, H. L., Xu, W. H., Cai, Q., Feng, M., Long, J., Zheng, W., ... & Shu, X. O. (2009). Polymorphisms and haplotypes in the caspase-3, caspase-7, and caspase-8 genes and risk for endometrial cancer: a

population-based, case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *18*(7), 2114-2122.

Xu, P., Liu, L., Wang, J., Zhang, K., Hong, X., Deng, Q., ... & Guo, H. (2013). Genetic variation in BCL2 3′-UTR was associated with lung cancer risk and prognosis in male Chinese population. *PloS one*, *8*(8), e72197.

Xu, W., Jiang, S., Xu, Y., Chen, B., Li, Y., Zong, F., ... & Wu, J. (2012). A meta-analysis of caspase 9 polymorphisms in promoter and exon sequence on cancer susceptibility. *PLoS One*, *7*(5), e37443.

Xu, Y., Fang, F., Ludewig, G., Ions, G., & Jones, D. (2004). A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA and cell biology*, *23*(9), 527-537.

Xu, Y., Deng, Q., He, B., Pan, Y., Li, R., Gao, T., ... & Cho, W. C. (2014). The diplotype Fas− 1377A/− 670G as a genetic marker to predict a lower risk of breast cancer in Chinese women. *Tumor Biology*, *35*(9), 9147-9161.

Xue, L., Han, X., Liu, R., Wang, Z., Li, H., Chen, Q., ... & Chong, T. (2016). MDM2 and P53 polymorphisms contribute together to the risk and survival of prostate cancer. *Oncotarget*, *7*(22), 31825-31831.

Yamak, N., Yaykasli, K. O., Yilmaz, U., Eroz, R., Uzunlar, A. K., Ankarali, H., ... & Baltaci, D. (2014). Association between survivin gene polymorphisms and the susceptibility to colon cancer development in the Turkish population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(20), 8963-8967.

Yamamoto, H., Ngan, C. Y., & Monden, M. (2008). Cancer cells survive with survivin. *Cancer science*, *99*(9), 1709-1714.

Yan, M. D., Hong, C. C., Lai, G. M., Cheng, A. L., Lin, Y. W., & Chuang, S. E. (2005). Identification and characterization of a novel gene Saf transcribed from the opposite strand of Fas.*Human molecular genetics*, *14*(11), 1465-1474.

Yan, S., Li, Y. Z., Zhu, X. W., Liu, C. L., Wang, P., & Liu, Y. L. (2013). Role of the CASP-9 Ex5+ 32 G> A polymorphism in susceptibility to cancer: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*, *5*(1), 175-180.

Yang, L., Zhu, H., Zhou, B., Gu, H., Yan, H., Tang, N., ... & Wang, B. (2009). The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Digestive diseases and sciences*, *54*(5), 1021-1028.

Yang, M., Sun, T., Wang, L., Yu, D., Zhang, X., Miao, X., ... & Lin, D. (2008). Functional variants in cell death pathway genes and risk of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(10), 3230-3236.

Yang, W., Li, Y., Ning, T., Cai, H., Chen, Z., Dong, Y., & Ke, Y. (2016). Polymorphisms in the 5′ upstream regulatory region of p21 WAF1/CIP1 and susceptibility to oesophageal squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, *6*(1), 1-9.

Yang, X., Xiong, G., Chen, X., Xu, X., Wang, K., Fu, Y., ... & Bai, Y. (2009). Polymorphisms of survivin promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *135*(10), 1341-1349.

Yang, X., Gao, F., Ma, F., Ren, Y., Chen, H., Liang, X., ... & Zhou, L. (2016). Association of the functional BCL-2 rs2279115 genetic variant and small cell lung cancer. *Tumor Biology*, *37*(2), 1693-1698.

Yao, Z., Duan, S., Hou, D., Heese, K., & Wu, M. (2007). Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *The EMBO journal*, *26*(4), 1068-1080.

Yazdani, N., Sayahpour, F. A., Haghpanah, V., Amiri, P., Shahrabi-Farahani, M., Moradi, M., ... & Amoli, M. M. (2012). Survivin gene polymorphism association with papillary thyroid carcinoma. *Pathology-Research and Practice*, *208*(2), 100-103.

Ye, Y., Yang, H., Grossman, H. B., Dinney, C., Wu, X., & Gu, J. (2008). Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to bladder cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *112*(11), 2467-2474.

Yilmaz, M., Tas, A., Kacan, T., Sari, M., & Silig, Y. (2017). Is there a relation between Murine double minute 2 T309G polymorphism and lung cancer risk in the Turkish population? *Turkish Journal of Biochemistry*, *42*(2), 123-129.

Yilmaz, M., Tas, A., Donmez, G., Kacan, T., & Silig, Y. (2018). Significant Association of the MDM2 T309G Polymorphism with Breast Cancer Risk in a Turkish Population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *19*(4), 1059-1062.

Yilmaz, S. G., Yencilek, F., Yildirim, A., Yencilek, E., & Isbir, T. (2017). Effects of caspase 9 gene polymorphism in patients with prostate cancer. *in vivo*, *31*(2), 205-208.

Yoo, N. J., Lee, J. W., Kim, Y. J., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Nam, S. W., ... & Lee, S. H. (2004). Loss of caspase-2,-6 and-7 expression in gastric cancers. *Apmis*, *112*(6), 330-335.

Young, R. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Molecular and cellular biology*, *13*(6), 3686-3697.

Yu, H., Huang, Y. J., Liu, Z., Wang, L. E., Li, G., Sturgis, E. M., ... & Wei, Q. (2011). Effects of MDM2 promoter polymorphisms and p53 codon 72 polymorphism on risk and age at onset of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Molecular carcinogenesis*, *50*(9), 697-706.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme. *Cell*, *75*(4), 641-652.

Yueh, T. C., Hung, Y. W., Shih, T. C., Wu, C. N., Wang, S. C., Lai, Y. L., ... & Ke, T. W. (2018). Contribution of murine double minute 2 genotypes to colorectal cancer risk in taiwan. *Cancer Genomics-Proteomics*, *15*(5), 405-411.

Zahedi, P., Aminimoghaddam, S., Sayahpour, F. A., Haghpanah, V., Amiri, P., Fereidoni, F., ... & Amoli, M. M. (2012). Association of survivin gene polymorphism with endometrial cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, *22*(1), 35-37.

Zeidler, R., Albermann, K., & Lang, S. (2007). Nicotine and apoptosis. *Apoptosis*, *12*(11), 1927-1943.

Zhan, Q., Kontny, U., Iglesias, M., Alamo Jr, I., Yu, K., Hollander, M. C., ... & Fornace Jr, A. J. (1999). Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. *Oncogene*, *18*(2), 297-304.

Zhang, B., Sun, T., Xue, L., Han, X., Zhang, B., Lu, N., ... & Zhang, X. (2007). Functional polymorphisms in FAS and FASL contribute to increased apoptosis of tumor infiltration lymphocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, *28*(5), 1067-1073.

Zhang, F., Xu, L., Wei, Q., Song, X., Sturgis, E. M., & Li, G. (2013). Significance of MDM2 and P14ARF polymorphisms in susceptibility to differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*, *153*(5), 711-717.

Zhang, G., Xu, Q., Liu, J., Lv, Z., Lu, Y., Yang, H., ... & Yuan, Y. (2019). Five P53 SNPs involved in low rectal cancer risk and prognosis in a Chinese population. *Journal of Cancer*, *10*(7), 1772-1780.

Zhang, J., Yang, Y., Li, W., Yan, L., Zhang, D., He, J., & Wang, J. (2019). TP53 gene rs1042522 allele G decreases neuroblastoma risk: a two-centre case-control study. *Journal of Cancer*, *10*(2), 467-471.

Zhang, M., Liang, Q., Zhang, L., Hao, Z., Zhou, J., Zhang, L., ... & Liang, C. (2018). p27-V109G polymorphism is not associated with the risk of prostate cancer: A case-control study of Han Chinese men in Central China. *Disease markers*, *2018*.

Zhang, N., Li, X., Tao, K., Jiang, L., Ma, T., Yan, S., ... & Yang, Q. (2011). BCL-2 (-938C> A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC medical genetics*, *12*(1), 48.

Zhang, X., Miao, X., Sun, T., Tan, W., Qu, S., Xiong, P., ... & Lin, D. (2005). Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *Journal of medical genetics*, *42*(6), 479-484.

Zhang, Y., & Herman, B. (2002). Ageing and apoptosis. *Mechanisms of ageing and development*, *123*(4), 245-260.

Zhang, Z., Wang, L. E., Sturgis, E. M., El-Naggar, A. K., Hong, W. K., Amos, C. I., ... & Wei, Q. (2006). Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research*, *12*(18), 5596-5602.

Zhang, Z., Yu, X., Guo, Y., Song, W., Yu, D., & Zhang, X. (2012). Genetic variant in CASP3 affects promoter activity and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer science*, *103*(3), 555-560.

Zhang, Z., Xuan, Y., Jin, X., Tian, X., & Wu, R. (2013). CASP-9 gene functional polymorphisms and cancer risk: a large-scale association study plus meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, *12*(3), 3070-3078.

Zhao, H., Zheng, L., Li, X., & Wang, L. (2014). FasL gene-844T/C mutation of esophageal cancer in South China and its clinical significance. *Scientific reports*, *4*, 3866.

Zhao, H., Mao, W., Chen, W., Du, P., Qin, J., Zhuang, C., ... & Wang, L. (2016). FasL-844T/C mutation may participate in occurrence and development of pulmonary squamous cell carcinoma in south China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(2), 4263-72.

Zheng, L., Tang, W., Shi, Y., Chen, S., Wang, X., Wang, L., ... & Yin, J. (2014). p21 rs3176352 G> C and p73 rs1801173 C> T polymorphisms are associated with an increased risk of esophageal cancer in a Chinese population. *PloS one*, *9*(5), e96958.

Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2006). Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*, *27*(10), 1939-1945.

Zhou, R. M., Wang, N., Chen, Z. F., Duan, Y. N., Sun, D. L., & Li, Y. (2010). Polymorphisms in promoter region of FAS and FASL gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *25*(3), 555-561.

Zhu, J., Qin, C., Wang, M., Yan, F., Ju, X., Meng, X., ... & Zhang, Z. (2010). Functional polymorphisms in cell death pathway genes and risk of renal cell carcinoma. *Molecular carcinogenesis*, *49*(9), 810-817.

Zhu, L., Wang, J., Yue, C., Yuan, W., Zhang, W., Shi, L., ... & Zuo, L. (2019). CDKN1B Val 109 Gly variant is not related to risk of prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, *120*(10), 18346-18356.

Zhu, Q., Wang, T., Ren, J., Hu, K., Liu, W., & Wu, G. (2010). FAS-670A/G polymorphism: A biomarker for the metastasis of nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, *411*(3-4), 179-183.

Zilani, M. N. H., Sarower, M. G., Hossain, A., Rahman, M. M., Uddin, S. J., & Hossain, M. G. (2018). Polymorphisms in cell cycle regulator gene p27kip1 and p16INK4A and lung cancer risk in a Bangladeshi population. *Pharmacology online*, *2*, 149-160.

Zinkel, S., Gross, A., & Yang, E. (2006). BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death & Differentiation*, *13*(8), 1351-1359.

Zörnig, M., Hueber, A. O., Baum, W., & Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *American Journal of Ophthalmology*, *133*(2), 301-302.

Zwezdaryk, K., Sullivan, D., & Saifudeen, Z. (2018). The p53/Adipose-Tissue/Cancer Nexus. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 457.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. ANEXOS.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8.1. ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE.

Se solicita su participación en el proyecto de investigación, que se está llevando a cabo en la Universidad de Santiago de Compostela, con la colaboración de varias áreas sanitarias de Galicia, denominado: "Perfiles genético-moleculares en pacientes con adenocarcinoma de próstata".

Dicho proyecto consiste en un estudio genético, mediante el cual se pretenden identificar factores de riesgo que se asocien al cáncer de próstata, analizando la posible relación existente entre determinados marcadores de ADN, distintos factores ambientales y el cáncer de próstata.

Su participación y contribución al proyecto consistirá en la donación de una pequeña muestra de sangre venosa (4-10 ml), que será extraída por un profesional especializado y en el día que suponga la mínima molestia para usted, y en la contestación a un reducido número de preguntas relativas fundamentalmente a sus hábitos de vida.

En la extracción de sangre en vena, se tomarán todas las medidas higiénico-sanitarias establecidas, empleándose material estéril y desechable. El riesgo que conlleva este proceso podría considerarse mínimo, como la sensación de mareo y la aparición de hematoma en la zona de la extracción.

Una vez otorgado su consentimiento y obtenida la muestra habrá concluido su participación en el proyecto, entendiendo que toda la información que se obtenga de su ADN, así como la información clínica utilizada en las investigaciones será tratada de forma estrictamente confidencial (conforme establece la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal).

Nombre y apellidos _____

Vecino de _____ **Teléfono**_____

Por el presente escrito doy mi consentimiento a que se me extraiga y analice una muestra de sangre, con fines exclusivamente investigadores.

Tras haber sido informado acerca de la naturaleza del estudio, tal como se desarrolla en el documento anexo, y habérseme aclarado los aspectos o dudas que yo pudiera haber planteado, he comprendido que dichos estudios se efectúan exclusivamente con fines investigadores, manteniendo el anonimato del donante, sin ánimo de lucro por parte de equipo investigador, y sin expectativas de compensación económica, ni de otro tipo, para el donante.

Asimismo, se me ha informado acerca de la posibilidad de poder acceder a los resultados de tales investigaciones, así como a la facultad de retirar en cualquier momento mi consentimiento para analizar mi muestra de sangre.

Establecidas así las condiciones de mi participación, expreso favorablemente mi consentimiento para dichos estudios. Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en _____ con fecha _____

Firma del participante. Firma del investigador.

Deseo retirar mi consentimiento para analizar mi muestra de sangre

Fecha _____ Firma del participante _____

Fírmese sólo en caso de revocación.

8.2. ANEXO 2. PERFIL GENÉTICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.

Datos personales			
Nombre y apellidos			
Fecha nacimiento		Nº Historia Clínica	
Lugar de nacimiento		Peso y altura	
Apellidos padre		Apellidos madre	
Origen abuelos paternos		Origen abuelos maternos	
Datos clínicos			
Tacto rectal		PSA (PSA l/t)	
Cáncer próstata (CaP)		Fecha diagnóstico	
Datos profesionales			
Profesión			
Años de trabajo			
Desarrollo sentado o de pie			
Antecedentes familiares de cáncer de próstata			
No/Sí			
Número de familiares en primer grado con CaP			
Hábito tabáquico			
Edad inicio			
Nº años fumando			
Nº cigarrillos/día			
Rubio/negro			
Apura cigarrillo			
Consumo de café			
Cantidad café/día			
Exposición solar			
Tiene una exposición solar elevada de forma voluntaria o por motivos profesionales (Agricultor, ganadero, marinero, etc.)			
Sí/No			
Horas de exposición diaria			

Motivo de exposición	
Exposición a xenobióticos	
Tiene una exposición elevada por motivos profesionales o personales (industrias químicas, metalúrgicas, asbesto, asfalto, carbón, carpintero, motorista, etc.)	
Sí/No	
Tiempo de exposición: horas, años	
Tipo de exposición (industria, etc.)	
Consumo de AINEs	
Enfermedades que requieran el uso prolongado y continuado o intermitente de AINEs: reumáticas, autoinmunes, cefalea, etc., o bien profilaxis tromboembólica.	
Tipo de AINE	
Enfermedad	
Dosis	
Tiempo total de tratamiento	
Patología urológica asociada	
Episodios de prostatitis, infección urinaria, orquiepididimitis; disuria o escozor eyaculatorio frecuentes, o cualquier síntoma que sugiera cuadro de prostatitis crónica.	
Sí/No	
Tipo de patología	
Duración (si procede)	
ETS (Sí/No, cuál)	

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM……..…48

Tabla 2. Antecedentes familiares y riesgo de cáncer de próstata……...61

Tabla 3. Parámetros de estudio para casos y controles……..144

Tabla 4. Cantidades y componentes de la mezcla de PCR……150

Tabla 5. Mezcla de SAP……151

Tabla 6. Mezcla iPLEX……152

Tabla 7. Lista de marcadores que se han incluido en la tesis doctoral……..157

Tabla 8. Descripción de OR mediante una tabla de contingencia……161

Tabla 9. Interpretación de los resultados del cálculo de OR……..161

Tabla 10. Tabla de contingencia (observados)……..165

Tabla 11. Tabla de contingencia (esperados)……165

Tabla 12. Clasificación del estado nutricional en función del IMC……..166

Tabla 13. Distribución de haplotipos obtenidos a partir de los genotipos de dos marcadores dialélicos.....169

Tabla 14. Distribución de combinaciones genotípicas a partir de los genotipos de dos marcadores dialélicos……...170

Tabla 15. Distribución de características demográficas en la población de estudio……173

Tabla 16. Distribución genotípica y alélica del rs2279115 (*BCL2*) en la muestra de estudio……..174

Tabla 17. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos…….175

Tabla 18. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa estratificando por variables……..177

Tabla 19. Asociación del rs2279115 (*BCL2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……178

Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del rs1052576 (*CASP9*) en la muestra de estudio……..179

Tabla 21. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..180

Tabla 22. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa estratificando por variables……183

Tabla 23. Asociación del rs1052576 (*CASP9*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……184

Tabla 24. Distribución genotípica y alélica del rs1045485 (*CASP8*) en la muestra de estudio……185

Tabla 25. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..186

Tabla 26. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa estratificando por variables……188

Tabla 27. Asociación del rs1045485 (*CASP8*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……189

Tabla 28. Distribución genotípica y alélica del rs1049216 (*CASP3*) en la muestra de estudio……190

Tabla 29. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..191

Tabla 30. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa estratificando por variables……192

Tabla 31. Asociación del rs1049216 (*CASP3*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……193

Tabla 32. Distribución genotípica y alélica del rs4647603 (*CASP3*) en la muestra de estudio……194

Tabla 33. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..195

Tabla 34. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa estratificando por variables……197

Tabla 35. Asociación del rs4647603 (*CASP3*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……198

Tabla 36. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1049216-rs2705897 (*CASP3*) y asociación con el PCa……199

Tabla 37. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1049216-rs2705897-rs4647603 (*CASP3*) y asociación con el PCa……200

Tabla 38. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs1049216-rs2705897-rs4647603 (*CASP3*) y asociación con el PCa……201

Tabla 39. Distribución genotípica y alélica del rs11196418 (*CASP7*) en la muestra de estudio……202

Tabla 40. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa según diferentes modelos genéticos…….203

Tabla 41. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa estratificando por variables…….205

Tabla 42. Asociación del rs11196418 (*CASP7*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables.....206

Tabla 43. Distribución genotípica y alélica del rs1800682 (*FAS*) en la muestra de estudio……207

Tabla 44. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..208

Tabla 45. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables……..210

Tabla 46. Asociación del rs1800682 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……211

Tabla 47. Distribución genotípica y alélica del rs3740286 (*FAS*) en la muestra de estudio……212

Tabla 48. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..213

Tabla 49. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables……215

Tabla 50. Asociación del rs3740286 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……217

Tabla 51. Distribución genotípica y alélica del rs10509561 (*FAS*) en la muestra de estudio……..218

Tabla 52. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa según diferentes modelos genéticos…….219

Tabla 53. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa estratificando por variables……...221

Tabla 54. Asociación del rs10509561 (*FAS*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……222

Tabla 55. Distribución genotípica y alélica del rs763110 (*FASLG*) en la muestra de estudio……223

Tabla 56. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..224

Tabla 57. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa estratificando por variables…….226

Tabla 58. Asociación del rs763110 (*FASLG*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……227

Tabla 59. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*) y asociación con el PCa……..229

Tabla 60. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs1800682-rs3740286-rs10509561 (*FAS*) y asociación con el PCa……230

Tabla 61. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs3740286 (*FAS)*-rs763110 (*FASLG)* y asociación con el PCa……..231

Tabla 62. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs10509561 (*FAS)*- rs763110 (*FASLG)* y asociación con el PCa……232

Tabla 63. Distribución genotípica y alélica del rs8073069 (*BIRC5*) en la muestra de estudio…….233

Tabla 64. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..234

Tabla 65. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa estratificando por variables…….235

Tabla 66. Asociación del rs8073069 (*BIRC5*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……236

Tabla 67. Distribución genotípica y alélica del rs9904341 (*BIRC5*) en la muestra de estudio……237

Tabla 68. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……238

Tabla 69. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa estratificando por variables…….242

Tabla 70. Asociación del rs9904341 (*BIRC5*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……243

Tabla 71. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs8073069-rs9904341 (*BIRC5*) y asociación con el PCa……245

Tabla 72. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs8073069-rs9904341 (*BIRC5*) y asociación con el PCa……246

Tabla 73. Distribución genotípica y alélica del rs1042522 (*TP53*) en la muestra de estudio……..247

Tabla 74. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa según diferentes modelos genéticos…….248

Tabla 75. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa estratificando por variables……..250

Tabla 76. Asociación del rs1042522 (*TP53*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……251

Tabla 77. Distribución genotípica y alélica del rs2279744 (*MDM2*) en la muestra de estudio……252

Tabla 78. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……..253

Tabla 79. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa estratificando por variables……..255

Tabla 80. Asociación del rs2279744 (*MDM2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……256

Tabla 81. Distribución genotípica y alélica del rs937283 (*MDM2*) en la muestra de estudio…….257

Tabla 82. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa según diferentes modelos genéticos…….258

Tabla 83. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa estratificando por variables……260

Tabla 84. Asociación del rs937283 (*MDM2*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……261

Tabla 85. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs937283 (*MDM2*)-rs2279744 (*MDM2*) y asociación con el PCa……..263

Tabla 86. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs937283 (*MDM2*)-rs2279744 (*MDM2*) y asociación con el PCa……264

Tabla 87. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs937283 (MDM2)-rs2279744 (*MDM2)*- rs1042522 (TP*53)* y asociación con el PCa……..265

Tabla 88. Distribución genotípica y alélica del rs2395655 (*CDKN1A*) en la muestra de estudio……..266

Tabla 89. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……267

Tabla 90. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa estratificando por variables……268

Tabla 91. Asociación del rs2395655 (*CDKN1A*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……270

Tabla 92. Distribución genotípica y alélica del rs34330 (*CDKN1B*) en la muestra de estudio……271

Tabla 93. Asociación del rs34330 (*CDKN1B*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……272

Tabla 94. Asociación del rs34330 con el PCa (*CDKN1B*) estratificando por variables……..274

Tabla 95. Asociación del rs34330 (*CDKN1B*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……275

Tabla 96. Distribución genotípica y alélica del rs2066827 (*CDKN1B*) en la muestra de estudio…….276

Tabla 97. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa según diferentes modelos genéticos……277

Tabla 98. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa estratificando por variables……..280

Tabla 99. Asociación del rs2066827 (*CDKN1B*) con el PCa valorando la interacción conjunta de variables……281

Tabla 100. Frecuencias de haplotipos formados por los polimorfismos rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*) y asociación con el PCa……283

Tabla 101. Frecuencias de combinaciones genotípicas formadas por los polimorfismos rs34330-rs2066827 (*CDKN1B*) y asociación con el PCa……284

Tabla 102. Interacciones genotípicas entre polimorfismos involucrados en la vía extrínseca de la apoptosis……...286

Tabla 103. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la caspasa-8 y las caspasas ejecutoras -3 y -7……287

Tabla 104. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis……...288

Tabla 105. Interacciones genotípicas entre polimorfismos de la caspasa-9 y las capasas ejecutoras -3 y -7……...……289

Tabla 106. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por la survivina……291

Tabla 107. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por el p53……292

Tabla 108. Interacciones genotípicas entre polimorfismos regulados por el p21……293

Tabla 109. Interacciones genotípicas entre polimorfismos reguladores del ciclo celular……294

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Aparato genitourinario masculino y glándula prostática……37

Figura 2. Tipos celulares de la próstata……..39

Figura 3. División de la próstata en lóbulos o en zonas……40

Figura 4. Progresión histológica del carcinoma prostático desde lesiones precursoras……43

Figura 5. Sistema de gradación histológica de *Gleason*……47

Figura 6. Tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad a la población mundial por 100.000 personas/año……52

Figura 7. Tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad a la población europea por 100.000 personas/año……52

Figura 8. Número estimado de casos prevalentes (a 5 años) como una proporción en 2018……53

Figura 9. Cambios morfológicos que experimenta una célula en apoptosis……..63

Figura 10. Estructura de la proteína Bcl-2……..68

Figura 11. Función anti-apoptótica de la proteína Bcl-2 en la vía mitocondrial según distintos modelos de activación……...70

Figura 12. Localización cromosómica del gen *BCL2*……71

Figura 13. Variabilidad poblacional del rs2279115 (*BCL2*) según la frecuencia del alelo menor A…..72

Figura 14. Relaciones filogenéticas entre los principales miembros de la familia de caspasas humanas y unificacion de nomenclatura……75

Figura 15. Estructura de las caspasas……76

Figura 16. Estructura de la caspasa-9……77

Figura 17. Representación esquemática del proceso de formación del apoptosoma……78

Figura 18. Regulación de la vía mitocondrial de la apoptosis mediante la caspasa-9……78

Figura 19. Localización cromosómica del gen *CASP9*……..79

Figura 20. Variabilidad poblacional del rs1052576 (CASP9) según la frecuencia del alelo menor A……..80

Figura 21. Estructura de la caspasa-8……81

Figura 22. Regulación de la muerte celular mediada por los receptores FAS y TRAIL……82

Figura 23. Regulación de la muerte celular mediada por el receptor TNFR1……..83

Figura 24. Localización cromosomómica del gen *CASP8*……..83

Figura 25. Variabilidad poblacional del rs1045485 (*CASP8*) según la frecuencia del alelo menor C……..84

Figura 26. Estructura de la caspasa-3……86

Figura 27. Representación esquemática de los sustratos escindidos por la caspasa-3 y su implicación funcional en la apoptosis……88

Figura 28. Localización cromosómica del gen *CASP3*……..89

Figura 29. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs1049216 (*CASP3*) y rs2705897 (*CASP3*) según la frecuencia del alelo menor G y T, respectivamente……..89

Figura 30. Variabilidad poblacional del rs4647603 (*CASP3*) según la frecuencia del alelo menor T……..90

Figura 31. Localización cromosómica del gen *CASP7*……90

Figura 32. Variabilidad poblacional del rs11196418 (*CASP7*) según la frecuencia del alelo menor A……..91

Figura 33. Estructura de las proteínas de membrana FAS y FASL……...93

Figura 34. Vía de señalización mediada por el sistema FAS/FASL……..96

Figura 35. Localización cromosómica del gen *FAS*……97

Figura 36. Variabilidad poblacional del rs1800682 (*FAS*) según la frecuencia del alelo menor A……..98

Figura 37. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs3740286 (*FAS*) y rs10509561 (*FAS*) según la frecuencia de los alelos menores G y A, respectivamente……99

Figura 38. Localización cromosómica del gen *FASLG*……..99

Figura 39. Variabilidad poblacional del rs763110 (*FASLG*) según la frecuencia del alelo menor C……100

Figura 40. Mecanismos reguladores de la vía FAS/FASL……101

Figura 41. Estructura de la survivina……105

Figura 42. Distintas formas en las que la survivina ejerce su función anti-apopótica……..106

Figura 43. Regulación de la survivina por parte del supresor tumoral p53……107

Figura 44. Localización cromosómica del gen *BIRC5*……108

Figura 45. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs9904341 (BIRC5) y rs8073069 (BIRC5) según la frecuencia del alelo menor C……109

Figura 46. Estructura del factor de transcripción p53……...113

Figura 47. Estructura del regulador negativo MDM2……..114

Figura 48. Factores estresantes y respuestas celulares del p53……115

Figura 49. Efectos del supresor tumoral p53 en la apoptosis……117

Figura 50. Localización cromosómica del gen *TP53*……117

Figura 51. Variabilidad poblacional del rs1042522 (*TP53*) según la frecuencia del alelo C, correspondiente al aminoácido prolina (C**C**C)……..118

Figura 52. Localización cromosómica del gen *MDM2*……119

Figura 53. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs2279744 (*MDM2*) y rs937283 (*MDM2*) según la frecuencia del alelo G……..120

Figura 54. Regulación de la progresión a través del ciclo celular……125

Figura 55. Estructura molecular de la proteína p21……..125

Figura 56. Esquema de la función celular de la proteína p21 en la detención del ciclo celular y la apoptosis……...127

Figura 57. Localización cromosómica del gen *CDKN1A*……..……128

Figura 58. Variabilidad poblacional del rs2395655 (*CDKN1A*) según la frecuencia del alelo menor A……129

Figura 59. Estructura de la proteína p27……...131

Figura 60. Función celular de la proteína p27 en la detención del ciclo celular……131

Figura 61. Vías de señalización que regulan la actividad de p27……133

Figura 62. Localización cromosómica del gen *CDKN1B*……134

Figura 63. Variabilidad poblacional de los polimorfismos rs34330 (*CDKN1B*) y rs2066827 (*CDKN1B*) según la frecuencia de los alelos menores T y G, respectivamente……135

Figura 64. Plantilla de genotipado……149

Figura 65. Esquema de MALDI-TOF……..153

Figura 66. Visualización por MALDI-TOF de la reacción de extensión de *primers*……154

Figura 67. Visualización de los resultados obtenidos en el espectrómetro de masas mediante el *software TyperAnalyzer* v.4.0.22……155

Figura 68. Salida del programa informático para el análisis manual del genotipado……156

Figura 69. Detalles de la salida para el análisis manual del genotipado……156

Figura 70. Detalles del espectro para un SNP……...157

Figura 71. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (CASP3-rs4647603)……..196

Figura 72. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs4647603, rs2705897 y rs1049216 del locus CASP3…….199

Figura 73. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (*FAS*-rs3740286)……214

Figura 74. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento del índice de masa corporal (*FAS*-rs10509561)……..220

Figura 75. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1800682, rs3740286 y rs10509561 del *locus FAS*…….228

Figura 76. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (BIRC5-rs9904341)……239

Figura 77. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs8073069 y rs9904341 del *locus BIRC5*……244

Figura 78. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*TP53*-rs1042522)……249

Figura 79. Evolución del riesgo a desarrollar PCa con el incremento de la edad (*MDM2*-rs937283)……..259

Figura 80. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs937283 y rs2279744 del *locus MDM2*……...262

Figura 81. Evolución del riesgo a desarrollar Pca con el incremento de la edad (*CDKN1B*-rs2066827)……278

Figura 82. Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs34330 y rs2066827 del *locus CDKN1B*……...282

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881 54 28 13 - Fax: 881 54 03 07
www.sergas.es

SERVIZO GALEGO de SAÚDE
Secretaría Xeral

Comité Ético de Investigación clínica
Telf: 881 54 64 25 FAX: 881 54 18 04
Email: ceic@sergas.es

DITAME DO COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALIZA

D. Xoán X. Casas Rodríguez , Secretario do Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 24/07/2008 o estudo:

Título: Relación entre el polimorfismo genético-molecular de marcadores implicados en la reparación del ADN y el cáncer de próstata: estudio de casos y controles
Promotor: José Luis Blázquez Caeiro
Código de Rexistro CEIC de Galicia: 2008/164

Que se cumpren os requisitos éticos aplicábeis a este tipo de estudos, están xustificados os riscos e molestias previsíbeis para o suxeito e é adecuado o procedemento para obter o consentimento informado.

E que este Comité acepta, de conformidade cos seus Procedementos Normalizados de Traballo, que o devandito estudo sexa realizado nos seguintes centros:

Centros	Investigadores principais
Universidade de Santiago de Compostela	José Luis Blázquez Caeiro

En Santiago de Compostela a luns, 28 de xullo de 2008
O Secretario,

SERGAS

Xoán X. Casas Rodríguez