

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis molecular de la multifocalidad en cáncer de próstata como proceso de entendimiento del modelo de carcinogénesis de la enfermedad

Yenifer Yamile Segura Moreno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2019

Análisis molecular de la multifocalidad en cáncer de próstata como proceso de entendimiento del modelo de carcinogénesis de la enfermedad

Yenifer Yamile Segura Moreno

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Ciencias – Bioquímica

Director (a):

Doctora Martha Lucía Serrano López

Línea de Investigación:

Biología e identificación de biomarcadores de cáncer en la población colombiana
(mecanismos moleculares y celulares)

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2019

Quienes no se han formado en Química o Medicina tal vez no comprendan lo verdaderamente arduo que es el problema del tratamiento del cáncer. Es casi —y subrayo el «casi»— tan difícil como encontrar un agente que disuelva el oído izquierdo, digamos, y deje intacto el derecho. Así de leve es la diferencia entre la célula cancerosa y su ancestro normal.

WILLIAM WOGLOM, patólogo estadounidense.

En memoria de mi padrastro...

Porque a pesar de su terrible enfermedad, me mostró como uno siempre debe luchar hasta el final.

Siempre fue de mis más grandes apoyos para lograr llevar a cabo esta tesis. Es triste para mí recordar que el último día de ensayos, ambos pasamos la noche en el Instituto, pero desgraciadamente por distintas razones...sin embargo, aun así estuvo apoyándome y a pesar de que ya no pudo estar presente para compartir conmigo este logro...

Solo me resta decir...Gracias por tanto, perdón por tan poco.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia–Sede Bogotá, especialmente a su Facultad de Ciencias, ya que además de formarme como una profesional en el pregrado, me permitió desarrollar esta maestría aportando todas las herramientas básicas necesarias para mejorar mis destrezas como profesional y emprender mi camino como investigadora. También quiero agradecer al Instituto Nacional de Cancerología por financiar esta propuesta de investigación que surgió desde mi aprendizaje en pregrado, aportando al igual que la Universidad, las herramientas necesarias para mi formación académica.

Agradezco a mi madre y a pesar de que por cumplir sus sueños, tampoco puede estar presente, siempre ha sido mi más grande apoyo y por quien soy lo que soy. A toda mi familia, en especial a mis hermanas, sobrino, mascotas, ya que siempre han sido un apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, a quienes les dedico cada peldaño escalado para cumplir todas mis metas en la vida. Y porque en los momentos difíciles, cuando todo parecía derrumbarse, y mi núcleo familiar no pudo estar completamente conmigo, toda la familia estuvo como apoyo fundamental.

A la profesora Martha Lucía Serrano, por asesorar desde el principio mi proceso de formación, dándome su acompañamiento académico y personal, tanto en la Universidad como en el Instituto, y de quien aprendí gran parte de lo que sé sobre la ardua tarea de hacer investigación. Es la mejor directora de tesis que pude tener, pues a pesar de que ambas coincidimos en tener momentos muy duros de nuestras vidas en la realización de ésta tesis, lo logramos.

Al grupo de Investigación en Biología del Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, quienes me acogieron en todo este proceso de formación en investigación, dándome

herramientas que no se consiguen en las aulas, sino que son solo producto de la experiencia. En especial a la Dra. Alba Lucía Combita por permitirme ser parte del grupo, a la Dra. Carolina Sanabria y a Natalia Acosta, por integrarme en su proyecto, permitirme usar parte de las muestras del mismo, brindarme ayuda en la comprensión del tema y asesorarme en el desarrollo de mi proyecto. Al monitor Aurelio Garrido, quien se aseguró que el proyecto se desarrollara correctamente según los requerimientos institucionales y las normas de buenas prácticas clínicas.

Finalmente, y no menos importante, quiero agradecer a los amigos que me conocen de toda una vida, a los que conocí en este proceso, también a los que me brindaron algo de su conocimiento, importante para la realización de esta tesis, y como son muchos, no los podré mencionar de forma específica, pero quiero agradecer en especial a quien me aguantó en los momentos más estresantes de la realización de la tesis y calmó mis ataques de pánico sin saber nada del tema, escuchando mis quejas exageradas y brindándome su apoyo emocional. A todos los que estuvieron en esos momentos en los que uno no se siente tan comprometido con la causa de la investigación y pierde un poco el entusiasmo, puesto que es siempre reconfortante tener con quienes despejarse cuando existen complicaciones, las cuales nos forjan cuando aprendemos a superarlas y son parte importante de nuestro crecimiento tanto profesional como personal. Gracias amigos, porque para mí, su presencia en mi vida ha sido importante en mi crecimiento personal.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es una enfermedad multifocal heterogénea histológica y molecularmente, tanto a nivel interindividual como intraindividual cuya biología no está bien entendida. A partir del uso de muestras FFPE de prostatectomías radicales de diferentes grados de lesión de 20 pacientes colombianos con CaP, se determinó cuantitativamente la expresión de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1, y se determinó la presencia/ausencia de la fusión TMPRSS2-ERG, para evaluar con estos biomarcadores la multiclonalidad y su asociación con subtipos del CaP.

La concordancia molecular por paciente, evaluada con las 5 alteraciones moleculares estudiadas, mostró que 6 pacientes podrían presentar un origen monoclonal, con 2 pacientes con concordancia completa y 4 pacientes con concordancia parcial, atribuida a la progresión de la enfermedad y no a un origen multiclonal; mientras que 14 tuvieron un aparente origen multiclonal (70%).

34% de los focos evaluados presentaron la fusión, sin embargo, por la sobreexpresión de ERG, 60% de los casos se tomaron como ETS(+). La expresión alterada de EZH2, NKX3.1 y SPINK-1, no fue excluyente entre ETS(+) y ETS(-); solo la ausencia de la fusión y una baja expresión de ERG clasificó 40% de los casos en ETS(-). Al hacer la evaluación por paciente, sólo se pudo hacer una clasificación de 70% ETS(+) vs 30% ETS(-).

Se encontró que, tanto los bajos niveles de expresión de NKX3.1 como la aparición de casos ETS (+), presentan asociación de forma significativa con el grado de displasia. Todas las alteraciones son de aparición temprana desde HGPIN.

La discordancia molecular multifocal intratumoral apoya el origen multiclonal del CaP y resalta la importancia de este tipo de análisis en el pronóstico, apuntando hacia la búsqueda de un posible tratamiento personalizado del paciente, aunque los subtipos evaluados no presentaron patrones homogéneos y excluyentes para dicha tarea.

Palabras clave: Cáncer de próstata, Marcadores de tumores biológicos, Heterogeneidad genética, Evolución Molecular, Tejidos embebidos, Pronóstico.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is a histologically and molecularly heterogeneous multifocal disease, both, at the interindividual and intraindividual levels, whose biology is not well understood. From the use of FFPE samples of radical prostatectomies of different degrees of injury of 20 Colombian patients with PCa, the expression of ERG, EZH2, NKX3.1 and SPINK-1 was determined quantitatively, and the presence/absence of the fusion TMPRSS2-ERG was determined, to evaluate with these biomarkers the multiclonality and its association with PCa subtypes.

Molecular concordance per patient, evaluated with the 5 molecular alterations studied, showed that 6 patients could present a monoclonal origin, with 2 patients with complete concordance and 4 patients with partial concordance, attributed to the progression of the disease and not to a multiclonal origin; while 14 had an apparent multiclonal origin (70%).

34% of the foci evaluated presented the fusion, however, due to the overexpression of ERG, 60% of the cases were taken as ETS(+). The altered expression of EZH2, NKX3.1 and SPINK-1, was not exclusive between ETS(+) and ETS(-); only the absence of the fusion and a low expression of ERG classified 40% of the cases in ETS(-). When the evaluation per patient was done, it could only do a classification of 70% ETS(+) vs 30% ETS(-).

It was found that both the low levels of NKX3.1 expression and the appearance of ETS (+) cases present a significant association with the degree of dysplasia. All alterations are of early onset from HGPIN.

The intratumoral multifocal molecular mismatch supports the multiclonal origin of PCa and highlights the importance of this type of analysis in the prognosis, pointing towards the search for a possible personalized treatment of the patient, although the evaluated subtypes did not present homogenous and exclusive patterns for this task.

Key words: Prostate cancer, Biological tumor markers, Genetic heterogeneity, Molecular evolution, Embedded tissues, Prognosis.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Lista de algunos símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema.....	5
1.1 Descripción del problema.....	5
1.2. Formulación del problema.....	6
1.3. Hipótesis.....	7
1.4. Justificación	7
2. Objetivos.....	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. Marco teórico.....	11
3.1. Generalidades del cáncer de próstata	11
3.1.1. Próstata normal.....	11
3.1.2 Carga de la enfermedad.....	13

3.1.3	Factores de riesgo del cáncer de próstata.....	14
3.1.4	Tamización y detección temprana.....	15
3.1.5	Diagnóstico histopatológico-Sistema de Gleason	17
3.1.6	Estadificación	20
3.1.7	Factores pronósticos.....	25
3.1.8	Tratamiento inicial del cáncer de próstata según el estadio	27
3.2	Carcinogénesis de la próstata	29
3.2.1	Rearreglos cromosómicos en cadena como evento genético inicial de la carcinogénesis de la próstata.....	33
3.3	Subtipos moleculares en cáncer de próstata	34
3.3.1	Subtipo ETS(+)	34
3.3.2	Subtipo ETS(-)	41
3.3.3	Subtipos propuestos por el TCGA.....	44
3.3.4	Valor pronóstico y predictivo de la clasificación del cáncer de próstata en subtipos moleculares	47
3.4	Heterogeneidad inter e intratumoral en Cáncer de Próstata	48
3.4.1	Análisis de multiclonalidad en Cáncer de próstata.....	48
4.	Metodología.....	51
4.1.	Diseño del estudio.....	51
4.2	Muestras utilizadas en el estudio	51
4.3	Descripción de las intervenciones	53
4.4	Procedimientos.....	53
4.5	Plan de análisis.....	58
5.	Resultados	61
5.1.	Primer objetivo.....	61
	El primer objetivo desarrollado es el siguiente:	61
5.2	Segundo objetivo.....	68

5.3 Tercer objetivo.....	74
5.4 Cuarto objetivo	76
6. Discusión	80
7. Conclusiones y perspectivas	89
7.1. Conclusiones.....	89
7.2 Perspectivas	89
8. Bibliografía.....	90

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de acción androgénica en la célula blanco.....	12
Figura 2. Sistema de clasificación histopatológica de Gleason.....	18
Figura 3. Carcinogénesis en el cáncer de próstata.....	29
Figura 4. Modelos propuestos en el origen de CaP resistente a castración.....	31
Figura 5. Cromoplexia y cromotripsis.....	33
Figura 6. Dominios estructurales característicos de miembros de la familia ETS organizados por subfamilias.....	35
Figura 7. Modelo de la regulación recíproca de EZH2 y Nkx3.1 por factores ETS competidores.....	36
Figura 8. Estructura y origen de gen de fusión TMPRSS2-ERG.....	38
Figura 9. Varios papeles de NKX3.1 en el desarrollo de la próstata, en la próstata adulta normal, y en el cáncer de próstata.....	40
Figura 10. Papel de SPINK-1 en CaP.....	42
Figura 11. Integración de los subtipos de CaP de diferentes estudios.....	46
Figura 12. Niveles de heterogeneidad en cáncer de próstata.....	49
Figura 13. Detección del gen de fusión TMPRSS2-ERG.....	61
Figura 14. Estandarización de los análisis de expresión absoluta de UBC en las muestras FFPE.....	63
Figura 15. Estandarización de los análisis de expresión relativa de ERG en las muestras FFPE.....	64
Figura 16. Estandarización de los análisis de expresión relativa de EZH2 en las muestras FFPE.....	65
Figura 17. Estandarización de los análisis de expresión relativa de NKX3.1 en las muestras FFPE.....	66
Figura 18. Estandarización de los análisis de expresión relativa de SPINK-1 en las muestras FFPE.	67

Figura 19. Patrones moleculares asociados a la expresión de EZH2 y NKX3.1.....	75
Figura 20. Comparación de la expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1 con los diferentes grados de lesión de CaP presentes en el estudio.....	78

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Significado clínico-patológico del estudio de los subtipos moleculares en CaP.....	47
Tabla 2. Iniciadores utilizados en el estudio para los diferentes ensayos de RT-PCR y qRT-PCR con sus respectivas condiciones óptimas estandarizadas.....	54
Tabla 3. Presencia de la fusión TMPRSS2-ERG y expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1, y SPINK-1 por foco en los diferentes pacientes analizados.....	69
Tabla 4. Análisis de los resultados de las alteraciones moleculares estudiadas discriminadas por grados de lesión.....	77

Lista de algunos símbolos y abreviaturas

ACS	American Cancer Society/Sociedad Americana del Cáncer
AR	Androgen receptor/Receptor de andrógenos
ARE	Androgen response element/Elementos de respuesta androgénica
ASCO	American Society of Clinical Oncology/ Sociedad Americana de Oncología Clínica
BRCA1	Gen Breast cancer 1/ Gen del cáncer de mama 1
BRCA2	Gen Breast cancer 2/ Gen del cáncer de mama 2
CaP	Cáncer de próstata
CHD1	Chromodomain-helicase-DNA binding protein 1/ Proteína de unión a cromodominio-helicasa-ADN 1
CP	Crossing point/ Punto de cruce (en qPCR)
CRPC	Castration resistant prostate cancer/Cáncer de próstata resistente a castración
DRE	Digital rectal exam/ Examen rectal digital
EGFR	Epidermal growth factor receptor/Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Epithelial-mesenchymal transition/Transición epitelio-mesénquima
EPE	Extraprostatic extension/Extensión extraprostática
ERG	ETS-related gene
ESE3	ETS Epithelial-specific expression 3
ETS	E-26 transformation-Specific/Factores de transcripción de transformación específica E-26
ETS(-)	Casos con ausencia de fusión TMPRSS2-ERG sin ERG sobreexpresado
ETS(+)	Casos con sobreexpresión de ERG y/o presencia de fusión TMPRSS2-ERG
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded/ Tejido fijado en formalina y embebido en parafina

XVIII “Análisis molecular de la multifocalidad en cáncer de próstata como proceso de entendimiento del modelo de carcinogénesis de la enfermedad”

FOXA1	Forkhead box protein A1
GL3	Patrón de Gleason 3
GL4	Patrón de Gleason 4
GL5	Patrón de Gleason 5
GST	Gen supresor tumoral
H3K27	Lisina 27 de la histona 3
HGPIN	High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia/Neoplasia Intraepithelial Prostática de Alto Grado
HPC1	Hereditary prostate cancer-1
IARC	International Agency for Research on cancer/Agencia internacional para investigación en cáncer
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
NKX3.1	NK3 Homeobox 1
PSA	Prostatic specific antigen/Antígeno prostático específico
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction/ Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
SCNA	Somatic copy number alterations/Alteración en número de copias somáticas
SPINK-1	Serin peptidasa Inhibitor, Kazal type 1
SPOP	Speckle-type Poz Protein
TAE	Tasa de incidencia ajustada por edad
TCGA	The Cancer Genome Atlas/Atlas del genoma del cáncer
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
UCSF-CAPRA	Cancer of the prostate risk assessment of University of California, San Francisco
WGS	Whole-Genome sequencing/Secuenciación completa del genoma

Introducción

De acuerdo con el informe de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), a nivel mundial el cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. En Colombia, el CaP es el cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de mortalidad por cáncer en hombres (IARC 2018). El problema con el manejo de esta enfermedad es la dificultad para estratificar apropiadamente el CaP entre casos indolentes o agresivos. Muchos casos solo requieren manejo expectante y el tratamiento excesivo puede resultar en una morbilidad significativa, sin embargo, también hay CaP que requiere tratamiento con terapia hormonal, prostatectomía radical o radioterapia, y también CaP resistente a andrógenos o CaP resistente a Castración, que es el responsable de la mayor mortalidad debida al CaP (Yu, Gulati, et al. 2010).

El CaP se presenta de manera multifocal con una heterogeneidad histopatológica característica, por lo cual se desarrolló el sistema de clasificación de Gleason, que se define como la suma de los dos patrones más comunes de diferenciación celular (Epstein et al. 2005), que es muy usado a nivel clínico, pero no es suficiente para determinar el pronóstico de esta enfermedad. Por esta razón, los patólogos informan sobre la multifocalidad y las características patológicas de los focos tumorales independientes en el estudio histopatológico del CaP (Huang et al. 2014).

Debido a la dificultad desde la clínica de discriminar entre los casos indolentes de los agresivos, en los últimos años la investigación del CaP, como en otros tipos de cáncer, se ha centrado en la determinación de biomarcadores moleculares que permitan establecer subtipos que contribuyan a predecir la progresión de la enfermedad y respuesta a terapia, siendo destacado el estudio realizado por el TCGA (The Cancer Genome Atlas) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

En la mayoría de los estudios, incluyendo el realizado por el TCGA, aproximadamente el 50% de los casos de CaP, presentan fusiones recurrentes principalmente entre el gen regulado por andrógenos, TMPRSS2 y el factor de transcripción que pertenece a la familia ETS, ERG, y esta fusión conduce a una sobreexpresión de ERG, por lo que la determinación de los subtipos moleculares comienza a partir de la presencia/ausencia de este ETS(+)/ETS(-)(Tomlins et al. 2005).

La pérdida de expresión del gen supresor tumoral NKX3.1 y el incremento de la expresión de EZH2 se han asociado con CaP ETS(+) de mal pronóstico (Bowen et al. 2000, Varambally et al. 2002, Kunderfranco et al. 2010, Lapointe et al. 2007, Börno et al. 2012, Melling et al. 2015). Sin embargo, también se ha encontrado que los niveles de mRNA de EZH2 pueden ser significativamente mayores en ETS(-) con respecto a los ETS(+), debido a una mayor alteración de eventos epigenómicos en los ETS(-) (Börno et al. 2012), aunque en ambos casos, ETS(+)/ETS(-), la sobreexpresión de EZH2 implica un mal pronóstico, pero significativamente mayor en los ETS(-) (Melling et al. 2015).

La proteína codificada por SPINK-1 es un inhibidor de tripsina, que puede funcionar como un factor de crecimiento autocrino, que se secreta de células acinares pancreáticas en el jugo pancreático, que se sobreexpresa específicamente en un subconjunto de cánceres ETS(-) (Paju et al. 2007, Tomlins et al. 2008) y se asocia con una disminución de la supervivencia (Ateeq et al. 2011), aunque su papel la carcinogénesis del CaP no está bien definido.

Como se ha mencionado anteriormente, el CaP es una enfermedad multifocal, lo que supone un reto más complejo en la tarea de dilucidar la carcinogénesis del CaP, puesto que la presencia de diferentes orígenes focales de la enfermedad se han asociado con heterogeneidad molecular y patológica, tanto en cada paciente como entre diferentes pacientes (Wei et al. 2017), que podría asociarse con un origen multiclonal del CaP. Hasta el momento los estudios han demostrado que las metástasis tumorales anatómicamente distintas de CaP se derivan de un único clon progenitor, sin embargo en el CaP primario hace falta una mayor investigación para entender de una mejor forma su compleja dinámica.

En este estudio se evaluó la presencia de fusiones cromosómicas ETS (TMPRSS2-ERG) y el nivel de expresión de los genes ERG, NKX3.1, EZH2 y SPINK-1, en muestras de tejido fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) en al menos 4 o 6 focos con diferentes grados de lesión (incluyendo HGPIIN y ganglio), en 20 pacientes con mal pronóstico de CaP (metastásico o resistente a castración), para definir el origen clonal del CaP intratumoral a partir de la determinación de la concordancia molecular de las cinco alteraciones moleculares evaluadas entre los diferentes focos y grados de lesión por paciente, teniendo en cuenta también la evolución de la enfermedad como factor de discordancia, con el fin de contribuir al entendimiento del origen de la heterogeneidad en el proceso de carcinogénesis de la enfermedad.

1. Planteamiento del problema

1.1. Descripción del problema

De acuerdo al informe de la IARC, a nivel mundial el cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. En Colombia, el CaP es el cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de mortalidad por cáncer en hombres (IARC 2018). El control del cáncer implica un conocimiento integral de los procesos de carcinogénesis que llevan al desarrollo de este. En algunos tumores se conoce bastante de este proceso (como en el cáncer de colon), mientras que en otros, como es el caso del CaP aún no se sabe lo suficiente.

No existe en la actualidad una herramienta adecuada que permita diferenciar pacientes con CaP de mal pronóstico de aquellos con enfermedad indolente que solo deberían tener un seguimiento controlado. El principal medio de determinación del tratamiento apropiado para un paciente con CaP se basa en la clasificación de Gleason, una evaluación de su heterogeneidad morfológica que está fuertemente relacionada con el pronóstico. A pesar de la estrecha asociación de la clasificación de Gleason al comportamiento del tumor, la relación de la heterogeneidad morfológica y la heterogeneidad molecular no ha sido dilucidada (Irshad et al. 2013, Kovtun et al. 2013, Sowalsky et al. 2013).

1.2. Formulación del problema

Los estudios moleculares del CaP han revelado numerosas alteraciones recurrentes del DNA, principalmente complejas redes de reordenamientos cromosómicos, que puede resultar cuando extremos rotos de DNA se barajan y se vuelven a ligar el uno al otro en una configuración novedosa, que desregulan genes implicados en el desarrollo de la próstata, la modificación de la cromatina, la regulación del ciclo celular y la señalización de andrógenos, entre otros procesos (Baca and Garraway 2012, Baca et al. 2013).

En los últimos años el estudio del CaP esta apuntado hacia la determinación de aparentes eventos moleculares excluyentes en la evolución del CaP, que podrían estar representando eventos tempranos y divergentes que direccionan el curso de la enfermedad (Barbieri et al. 2012). Varios autores postulan que clasificar los CaP de acuerdo a estas alteraciones moleculares ayudaría a comprender la gran variabilidad de la enfermedad e identificar subtipos homogéneos asociados con el riesgo y tal vez susceptibles de terapias dirigidas (Tomlins et al. 2015, Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Barbieri et al. 2013).

El CaP se manifiesta con la presencia de múltiples focos (separados anatómicamente por tejido benigno o de hiperplasia benigna prostática), en muchos casos con diferentes grados de lesión en un mismo órgano prostático, según manifiesta la escala de Gleason. Sin embargo, no queda claro si los focos tumorales pueden surgir como clones independientes y en caso afirmativo, en qué medida la heterogeneidad molecular y patológica, entre estos clones es un factor determinante de la historia natural de la enfermedad (Barbieri, Demichelis, and Rubin 2014).

1.3. Hipótesis

Ho: En el CaP, de un mismo individuo, los diferentes focos tumorales tienen todos los mismos tipos de alteraciones genéticas y corresponden a un solo subtipo molecular.

Ha: En el CaP, de un mismo individuo, los diferentes focos tumorales tienen diferentes alteraciones genéticas (origen multiclonal) asociadas a diferentes subtipos moleculares.

1.4. Justificación

El CaP es un cáncer muy frecuente en nuestro país y desde el punto biológico se caracteriza por ser heterogéneo histológica y molecularmente, no solamente entre los individuos, sino también a nivel de los múltiples focos originados en la glándula prostática de un solo individuo. Cuando se analiza y cuantifica la heterogeneidad tumoral molecular, los estudios a menudo sólo se basan en el análisis de un foco por paciente y los CaP se clasifican en un subtipo molecular. Sin embargo, un segmento de tejido no puede representar completamente la biología de un cáncer multifocal.

La evaluación de distintos focos con diferentes grados de lesión en un mismo paciente (Minner et al. 2013, Fontugne et al. 2016), incluyendo la lesión precursora HGPIN, con la cual también se han encontrado discordancias entre diferentes focos de una misma próstata (Cheng et al. 1998, Bostwick et al. 1998) y metástasis, en cuanto a la presencia de alteraciones moleculares, pueden aportar información valiosa al entendimiento del proceso de carcinogénesis de ésta enfermedad y el origen clonal de múltiples focos, aunque esto está actualmente en investigación en otros países, en nuestro país no existen publicaciones que demuestren que este tema está siendo abordado y se considera que puede ser importante para contribuir al conocimiento del CaP. Datos recientes han sugerido que en un paciente dado, un solo clon es responsable para la dispersión de todos

los focos metastásicos, lo que sugiere que la identificación del clon "letal" es de suma importancia (Liu et al. 2009, Haffner et al. 2013, Sowalsky et al. 2013).

En este estudio se propone buscar si de alguna manera el panorama genético que puede estar definiendo la heterogeneidad del CaP multifocal y si, éste puede ser organizado a partir de una clasificación molecular, que permita dilucidar los pasos en la historia natural del CaP, desde el inicio de la enfermedad hasta la progresión, metástasis, aparición de resistencia al tratamiento, y la muerte, tema que no ha sido abordado en nuestro país.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Caracterizar algunas alteraciones moleculares de CaP (presencia/ausencia de rearrreglos cromosómicos TMPRSS2-ERG y los niveles de expresión de SPINK-1, EZH2, NKX3.1 y ERG) en diferentes focos de un mismo individuo para determinar su origen clonal.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar los niveles de expresión de NKX3.1, EZH2, SPINK-1 y ERG, además de determinar la presencia/ausencia del gen de fusión TMPRSS2- ERG, en tejido sano, HGPIN y tumoral, en diferentes focos de tejidos de próstata de pacientes con cáncer.
- Analizar el grado de concordancia de las alteraciones moleculares entre los focos que permita establecer el origen clonal.
- Determinar si dichas alteraciones podrían definir diferentes subtipos moleculares del CaP.

Analizar si existe asociación entre la presencia o ausencia de las alteraciones moleculares estudiadas y el grado de diferenciación del foco

3. Marco teórico

3.1. Generalidades del cáncer de próstata

3.1.1. Próstata normal

En principio, para hablar de CaP es necesario empezar por conocer la próstata normal. La próstata es una glándula exocrina y apocrina que rodea la uretra en la base de la vejiga, parte del sistema reproductor masculino y produce importantes componentes del líquido seminal. La próstata se divide en 3 zonas: periférica, transicional y central (McNeal, Redwine, et al. 1988). Es importante destacar que la zona periférica más externa ocupa la mayor parte del volumen prostático, y allí se originan la mayoría de los CaP, razones que muestran la importancia de examinar la glándula a través del tacto rectal. Por el contrario, la hiperplasia prostática benigna surge en la zona de transición y es una condición en la cual la glándula prostática está agrandada y no hay CaP. A nivel histológico, la próstata consiste en un epitelio pseudo-estratificado con tres tipos de células epiteliales diferenciadas: lumbinales, basales y neuroendocrinas (Schalken and van Leenders 2003).

Los andrógenos circulantes son esenciales para el desarrollo normal de la próstata, así como para el desarrollo del CaP a través de sus interacciones con el receptor de andrógenos (AR por sus siglas en inglés) (Figura 1). El AR es un factor de transcripción que regula la expresión génica dependiente de andrógenos. El AR se activa por la unión de alta afinidad de la testosterona o su metabolito reducido, la dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno más potente requerido para el desarrollo del tracto reproductivo masculino. En ausencia del ligando, el AR permanece inactivo en el citoplasma por su unión a proteínas de choque térmico. Cuando el andrógeno se une al AR, las proteínas de choque térmico se disocian del complejo, permitiendo la dimerización y activación del AR, el cual se trasloca al núcleo, donde se une a secuencias de reconocimiento específicas conocidas como elementos de respuesta androgénica (ARE) en el promotor y las regiones

potenciadoras de genes diana específicos de la próstata como PSA y TMPRSS2, manteniendo el fenotipo epitelial de próstata diferenciado (Green, Mostaghel, and Nelson 2012).

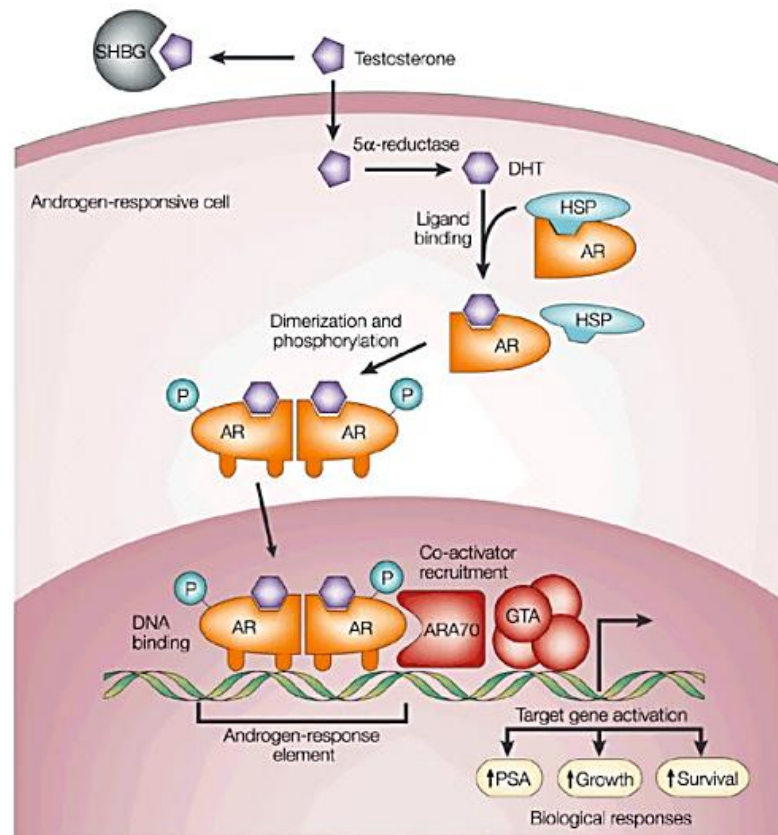


Figura 1. Mecanismo de acción androgénica en la célula blanco. La testosterona circula en la sangre unida a la albúmina (no se muestra) y/o la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona libre entra en las células de la próstata y se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la acción de la enzima 5- α reductasa. En el citoplasma, la unión de DHT al receptor de andrógenos (AR) induce la disociación de las proteínas de choque térmico (HSPs) y la fosforilación del receptor. El AR se dimeriza y puede unirse a elementos de respuesta a andrógenos en las regiones promotoras de los genes diana. Los coactivadores (como ARA70) y los corepresores (no mostrados) también se unen al complejo AR-DHT, facilitando o previniendo, respectivamente, su interacción con el aparato de transcripción general (GTA). La activación o represión de los genes diana conduce a respuestas biológicas que incluyen el crecimiento, la supervivencia y la producción de antígeno prostático específico (PSA). No se muestran las posibles acciones de andrógenos independientes de la transcripción. Tomado de Feldman and Feldman 2001.

3.1.2 Carga de la enfermedad

El CaP es un problema de salud pública puesto que de acuerdo al informe del IARC a nivel mundial es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. En Colombia, es el CaP es el cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de mortalidad por cáncer en hombres (IARC, 2018).

Según las cifras del grupo de Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Cancerología, los departamentos con mayor tasa de incidencia por edad (TAE x 100.000), registrada entre el 2000 y el 2006, de forma descendente fueron San Andrés y Providencia, Atlántico, Valle del Cauca, Bogotá D.C, Bolívar y Chocó (INC-ESE 2006). A partir de la información publicada por el DANE después del censo del 2005, se concluye que la mayoría de estos departamentos (excepto Bogotá) tienen predominio de población afrodescendiente, que es reconocida como un factor de riesgo no modificable para CaP (DANE 2005, INC-ESE 2006, Pardo et al. 2017). Por otro lado las regiones colombianas en las que la incidencia es más baja son: Amazonas (TAE 13,9 x 100.000), Putumayo (TAE 22,9 x 100.000), Nariño (TAE 26,2 x 100.000), Caquetá (TAE 29,1 x 100.000) y Guajira (TAE 32,6 x 100.000) haciendo la salvedad que con excepción de Nariño y la Guajira, estos departamentos tienen menos del 10% de su población afrocolombiana (INC-ESE 2006, Pardo et al. 2017).

En Colombia, el CaP ocupó el segundo lugar entre las muertes ocasionadas por cáncer en hombres durante el período 2007 a 2011, con una tasa estandarizada por edad de 11,9 x 100.000 hombres. La tasa nacional de mortalidad por CaP ajustada por edad se ha definido entre 12,4 x 100.000 hombres y 11,0 x 100.000 hombres. Las edades con mayor afectación son las que superan los 65 años durante todo el decenio, seguida por el grupo entre los 55 y 64 años de edad (INC-ESE 2006). La tendencia con respecto a la mortalidad por CaP es preocupante, por cuanto se ha triplicado durante los últimos treinta años, lo cual implica cerca de 2.400 defunciones al año, sobre todo en mayores de 70 años (COLCIENCIAS and INC-ESE 2013).

3.1.3 Factores de riesgo del cáncer de próstata

En la mayoría de los casos, el CaP es una enfermedad multifactorial. Lo más frecuente es que sea esporádica, pero alrededor de un 15% de los casos se pueden explicar por asociaciones familiares y/o hereditarias (Abouassaly et al. 2012), y se ha visto que entre más cercano sea el antecedente familiar, un mayor número de familiares afectados y a una edad de presentación más temprana (< 55 años), mayor será el riesgo (Carter et al. 1992). Está claramente definido que tener padre, hermano o más de 2 familiares en primer grado de consanguinidad con CaP, aumenta el riesgo en 2,17, 3,37 y 5,08 veces, respectivamente (Zeegers, Jellema, and Ostrer 2003). Se han encontrado asociaciones y un mayor riesgo en pacientes con presencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, así como mutaciones en el gen HPC1 (gen del CaP, por sus siglas en inglés) (Struewing et al. 1997).

A la fecha, el principal factor de riesgo es la edad, ya que la posibilidad de presentar CaP va aumentando a medida que una persona envejece, siendo del 2% en menores de 50 años y del 63% después de los 65 años. Así mismo, en estudios de autopsias se han encontrado focos microscópicos en el 30% de los hombres en la cuarta década de vida y asciende a más de 75% en mayores de 85 años (Abouassaly et al. 2012).

Otro factor de riesgo claramente establecido es la raza. Se conoce que los pacientes de raza negra tienen una mayor incidencia, aproximadamente del 50%, y una mortalidad 2,5 veces superior a los de raza blanca; los latinos tienen una incidencia 13% menor con una mortalidad 17% menor (ACS 2019).

Ambientalmente se han encontrado asociaciones débiles con el componente nutricional relacionadas con la distribución geográfica. Se ha visto en estudios poblacionales que las dietas ricas en grasas y productos lácteos podría aumentar el riesgo de CaP, así mismo, a mayor índice de masa corporal se aumentaría la incidencia y el riesgo de CaP de peor pronóstico. Esto podría explicarse por vías moleculares similares a las de la resistencia a la insulina (Renehan et al. 2008, Spratt et al. 2013, Price et al. 2012).

3.1.4 Tamización y detección temprana

En 1994, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el uso del análisis del PSA en combinación con el examen digital del recto (DRE, por sus siglas en inglés) para examinar si hombres asintomáticos presentan CaP (Oh WK 2003, el-Shirbiny 1994). El análisis del PSA junto con el DRE se ha empleado como estrategia de detección temprana del CaP en hombres mayores de 50 años en Colombia (COLCIENCIAS and INC-ESE 2013).

- **DRE**

El DRE consiste en la palpación de dicha glándula, a través de un tacto rectal, en busca de un crecimiento anormal y/o cambios en la consistencia. Se utiliza para determinar si una lesión es palpable y así se puede efectuar la estadificación local de la enfermedad (clínica estadio T) con una sensibilidad del 33% (Thompson et al. 1984). Sin embargo, debido a su escasa sensibilidad y falta de reproducibilidad, el DRE puede tanto sobreestimar como subestimar la extensión de la enfermedad. El tacto rectal se puede utilizar en combinación con otros parámetros para ayudar a predecir la extensión del tumor (McDougal et al. 2011).

- **Antígeno prostático específico**

El PSA es una glicoproteína cuya síntesis es exclusiva de la próstata cuya función es disolver el coágulo seminal. Una parte de este PSA pasa a la circulación sanguínea. Precisamente este PSA que pasa a la sangre es el que se mide para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer (el-Shirbiny 1994). Con la introducción del PSA en la década de los noventa, como prueba de detección temprana, se presentó un cambio importante en el estadio de presentación del CaP, disminuyendo el diagnóstico de cáncer metastásico del 16% a menos del 1% (según datos norteamericanos). Adicionalmente, la supervivencia a 5 años cambió de 75% a más del 99% desde la década de los ochenta al año 2000, y la mortalidad específica por cáncer disminuyó un 33% aproximadamente (Nogueira, Corradi, and Eastham 2009).

En general se considera que valores $<4\text{ng/mL}$ son normales, pero es importante saber que los valores normales de PSA pueden variar significativamente según la edad, raza y volumen de la próstata (Jacobsen et al. 2012). Por ejemplo, por cada mililitro de aumento del volumen prostático, el PSA puede aumentar un 4%. Es así que la variabilidad por volumen es del 30% y por edad del 5%. En caso de anormalidad se debe hacer una verificación con una nueva muestra 4 semanas después, idealmente en el mismo laboratorio, ya que éste puede elevarse falsamente por alguna manipulación prostática y existe una variabilidad del 20–25% de la prueba entre diferentes laboratorios. Es por esto que los valores deben ser interpretados individualmente para cada paciente (Jacobsen et al. 2012).

Por todo lo anterior, se han diseñado múltiples estrategias para tratar de convertir este marcador en uno más dinámico y así tomar la decisión de realizar una biopsia de próstata, con una probabilidad mayor de detección de CaP, tratando de aumentar la sensibilidad especialmente en pacientes más jóvenes y aumentar la especificidad en pacientes de edad más avanzada, con el fin de llevar a tratamientos más agresivos en los primeros y más conservadores a los últimos. Dentro de estas estrategias, las más conocidas son: la velocidad del PSA, la relación del PSA libre/total, la densidad de PSA y el PSA ajustado a la edad. Cabe anotar que estas estrategias no tienen el soporte científico ideal. Se recomienda aplicar estas estrategias después de una primera biopsia negativa (COLCIENCIAS and INC-ESE 2013).

En Colombia no se recomienda la tamización organizada poblacional en CaP. A partir de la opinión del consenso nacional de expertos, se recomienda la tamización de oportunidad como estrategia de detección temprana del CaP en hombres mayores de 50 años, asintomáticos, que acudan a consulta médica por diferentes causas, y consiste en la combinación de PSA ajustado para la edad y tacto rectal en una frecuencia no inferior a 5 años y previa explicación de los potenciales riesgos y beneficios para el paciente, promoviendo una toma de decisiones concertada. En los pacientes en quienes se registre un primer nivel de PSA alterado acorde con la edad, en presencia de tacto rectal normal, se recomienda la repetición de la prueba en el curso de los siguientes 6 meses (Galán, Puerto, and Villareal 2015).

La Asociación Americana de Cáncer realizó una revisión sistemática de la literatura sobre el rendimiento del PSA, encontrando que con disminuir el valor de corte de 4 ng/mL a 3 ng/mL, se presentaba un aumento de la sensibilidad y ligero aumento de la tasa de detección de cáncer, pero a costa de disminución en la especificidad y valor predictivo negativo (Wolf et al. 2010). En general la sensibilidad de la prueba con un punto de corte de 4,0 ng/mL es del 21% para cualquier cáncer y 51% para cánceres agresivos de alto grado. Con éste mismo punto de corte la especificidad es del 91%. Con respecto al valor predictivo positivo con punto de corte de 4,0 ng/mL o mayor es del 30%. Esto quiere decir que en 1 de 3 individuos con PSA elevado, se detectará un CaP en la biopsia (Meigs et al. 1996).

Existen estudios que controvierten la tamización con PSA como el Estudio Europeo aleatorizado de tamización para CaP y Estudios de tamización para CaP, pulmón, colon-recto y ovario realizado en Estado Unidos (Schröder et al. 2009, Schröder et al. 2012, Andriole et al. 2012, Crawford et al. 2011). El primer estudio, avala y sugiere el efecto benéfico de la tamización en la patología prostática pero no permite aclarar los periodos y edades de intervención (Schröder et al. 2009, Schröder et al. 2012), mientras que el segundo estudio (Andriole et al. 2012, Crawford et al. 2011) evidenció un aspecto importante que fue la identificación de los efectos secundarios de las biopsias de próstata, no siendo esta la causa de no recomendarla, pero si la baja especificidad del PSA para encontrar biopsias positivas, que para este grupo investigador es inaceptable usarlo en un contexto de tamización basado en la población.

3.1.5 Diagnóstico histopatológico-Sistema de Gleason

- **Tumor dominante/índice**

Desde 1935, Moore había reconocido que los carcinomas prostáticos son a menudo multifocales (Andreoiu and Cheng 2010), lo cual hace que el análisis histopatológico de este tipo de tumores sea un proceso bastante dispendioso, debido a esta heterogeneidad. Generalmente consiste en un tumor dominante (o índice) y uno o varios tumores más pequeños separados. El tumor dominante/índice (McNeal, Price, et al. 1988) en los tumores multifocales se refiere al foco tumoral de mayor tamaño, que se correlaciona con los parámetros patológicos importantes desde el punto de vista pronóstico (volumen

tumoral, puntuación de Gleason, extensión extracapsular, invasión de la vesícula seminal y parámetros de estadificación). Esto se cumple en la mayoría de los casos (88,7%); sin embargo, estos parámetros patológicos adversos a veces no se observan en el tumor dominante, sino en focos secundarios de menor volumen en un número significativo de casos (11,3%), por lo que los patólogos informan sobre la multifocalidad y las características patológicas de todos los focos tumorales independientes en los estudio histopatológicos de CaP (Huang et al. 2014).

- **Puntuación de Gleason para la determinación de los grados del cáncer de próstata**

Debido a la multifocalidad del CaP, se estableció el sistema de Gleason con el cual se hace una determinación de diferentes grados de diferenciación del CaP (Epstein et al. 2005). Inicialmente, el patólogo observa cómo se disponen las células cancerosas en la próstata y asigna una puntuación en una escala de 3 a 5 a cada foco, esto es conocido como el patrón de Gleason (GL), los cuales a menudo comprenden patrones de diferenciación diferentes que reflejan la heterogeneidad del CaP. (Figura 2).

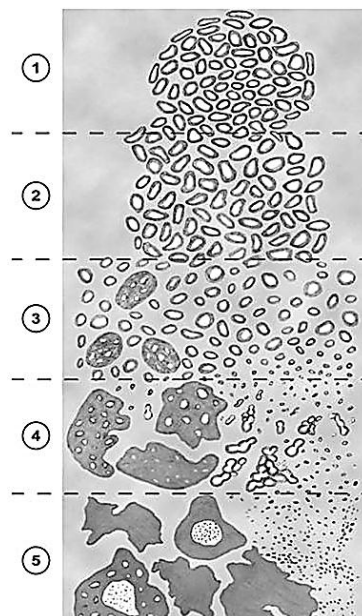


Figura 2. Sistema de clasificación histopatológica de Gleason. A. Sistema de patrones de Gleason de 2005. Patrones de Gleason del más diferenciado (1) al menos diferenciado (5). Tomado de (Epstein et al. 2005)

Posteriormente, el patólogo determina los dos GL más frecuentemente encontrados y la sumatoria de estos se denomina puntaje de Gleason (PG), que está entre 6 y 10. Las puntuaciones de Gleason de 5 o menos no se usan. La puntuación de Gleason más baja es 6, que es un cáncer de grado bajo. Una puntuación de Gleason de 7 es un cáncer de grado medio, y una puntuación de 8, 9 o 10 es un cáncer de grado alto. Un cáncer de grado más bajo crece más lentamente y tiene menos probabilidades de diseminarse que un cáncer de grado alto.

- ✓ **Gleason X:** la puntuación de Gleason no se puede determinar.
- ✓ **Gleason 6 o inferior:** las células están bien diferenciadas, lo cual significa que tienen un aspecto similar a las células sanas.
- ✓ **Gleason 7:** las células están moderadamente diferenciadas, lo cual significa que tienen un aspecto algo similar a las células sanas.
- ✓ **Gleason 8, 9 o 10:** las células están poco diferenciadas o no diferenciadas, lo que significa que tienen un aspecto muy diferente a las células sanas.

Los médicos analizan la puntuación de Gleason además del estadio para ayudar a planificar el tratamiento. Por ejemplo, la vigilancia activa puede ser una opción para un paciente con un tumor pequeño, un nivel bajo de PSA y una puntuación de Gleason de 6. Los pacientes con una puntuación de Gleason más alta podrían necesitar un tratamiento más intensivo, incluso si el cáncer no es grande o no se ha diseminado.

Desde el 2016 las puntuaciones de Gleason se agrupan en grupos de grados simplificados (Epstein et al. 2016):

- ✓ Grupo de grado 1 = Gleason 6
- ✓ Grupo de grado 2 = Gleason 3 + 4 = 7
- ✓ Grupo de grado 3 = Gleason 4 + 3 = 7
- ✓ Grupo Gleason 4 = Gleason 8
- ✓ Grupo Gleason 5 = Gleason 9 o 10

3.1.6 Estadificación

Según la “American Society of Clinical Oncology” ((ASCO) 2018), la determinación del estadio es una manera de describir dónde está ubicado el cáncer, si se ha diseminado o hacia dónde y si está afectando otras partes del cuerpo. Los médicos utilizan pruebas de diagnóstico para determinar el estadio del cáncer, de manera que es posible que la estadificación no se establezca hasta que se hayan realizado todas las pruebas.

La determinación del estadio del CaP también implica el análisis de los resultados de las pruebas para determinar si el cáncer se diseminó desde la próstata a otras partes del cuerpo. Conocer el estadio ayuda al médico a decidir cuál es el mejor tratamiento y puede ayudar a predecir el pronóstico de un paciente, es decir, la probabilidad de recuperación. Los tipos de determinación del estadio del CaP son dos:

- ✓ **Estadio clínico.** Esto se basa en los resultados del DRE, el análisis del PSA y la puntuación de Gleason. Los resultados de estas pruebas ayudarán a determinar si las radiografías, las gammagrafías óseas, las exploraciones por tomografía computarizada o las imágenes de resonancia magnética también son necesarias. Si las exploraciones son necesarias, pueden aportar más información para ayudar al médico a determinar el estadio clínico.
- ✓ **Estadio patológico.** Esto se basa en la información que se obtiene durante la cirugía y en los resultados de laboratorio, referidos como patología, del tejido prostático extirpado durante la cirugía. La cirugía, con frecuencia, incluye la extirpación de toda la próstata y de algunos ganglios linfáticos. El examen de los ganglios linfáticos extirpados puede proporcionar más información del estadio patológico.

- **Sistema TNM de determinación del estadio**

Una herramienta que los médicos utilizan para describir el estadio es el sistema TNM. Los médicos utilizan los resultados de las pruebas de diagnóstico y las exploraciones para responder a las siguientes preguntas ((ASCO) 2018):

- ✓ **Tumor (T):** ¿Qué tan grande es el tumor primario? ¿Dónde está ubicado?
- ✓ **Ganglio (Node, N):** ¿el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos? De ser así, ¿a dónde y cuántos?
- ✓ **Metástasis (M):** ¿el cáncer ha hecho metástasis en otras partes del cuerpo? De ser así, ¿en dónde y en qué medida?

Los resultados se combinan para determinar el estadio del cáncer de cada persona. Hay 5 estadios: el estadio 0 (cero) y los estadios I a IV (1 a 4). El estadio es una forma frecuente de describir el cáncer, de manera que los médicos puedan planificar de forma conjunta los mejores tratamientos.

Tumor (T): Mediante el sistema TNM, se utiliza la “T” más una letra o número (0 a 4) para describir el tamaño y la ubicación del tumor. Algunos estadios también se dividen en grupos más pequeños que ayudan a describir el tumor aún con más detalle. A continuación, se incluye información sobre los estadios específicos del tumor. Si se determina que el tumor está en un estadio clínico, a menudo se expresa como cT. Si se determina que está en un estadio patológico, se expresa como pT.

T clínico:

TX: no se puede evaluar el tumor primario.

T0 (T más cero): No hay evidencia de cáncer en la próstata.

T1: el tumor no puede sentirse durante un DRE y no se observa durante las pruebas por imágenes. Se puede encontrar al hacer una cirugía por otra razón, por lo general para la BPH, o por un crecimiento anormal de las células no cancerosas de la próstata.

- ✓ **T1a:** el tumor se encuentra en el 5 % o menos del tejido prostático extirpado en la cirugía.
- ✓ **T1b:** el tumor se encuentra en más del 5 % del tejido prostático extirpado en la cirugía.
- ✓ **T1c:** el tumor se encontró durante una biopsia con aguja, en general porque el paciente tenía un nivel elevado de PSA.

T2: el tumor se encuentra en la próstata únicamente, no en otras partes del cuerpo. Es lo suficientemente grande como para palparlo durante un DRE.

- ✓ **T2a:** el tumor compromete la mitad de un lado de la próstata.

✓ **T2b:** el tumor compromete más de la mitad de un lado de la próstata, pero no ambos lados.

✓ **T2c:** el tumor ha crecido a ambos lados de la próstata.

T3: el tumor ha crecido a través de la próstata, en uno de los lados y hacia el tejido justo en la parte externa de la próstata.

✓ **T3a:** el tumor ha crecido a través de la próstata, ya sea en uno o en ambos lados de la próstata. Esto se denomina extensión extraprostática (extraprostatic extension, EPE).

✓ **T3b:** el tumor invadió la(s) vesícula(s) seminal(es), el (los) conducto(s) que transporta(n) semen.

T4: el tumor está fijo o está creciendo hacia el interior de estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales, como el esfínter externo, la parte de la capa muscular que ayuda a controlar la micción; el recto; la vejiga, los músculos elevadores o la pared pélvica.

T patológico

No existe clasificación en TX, T0 o T1 para el estadio patológico del CaP.

T2: el tumor se encuentra solo en la próstata.

T3: hay EPE. El tumor ha crecido a través de la próstata, en uno o en ambos lados de la próstata.

✓ **T3a:** hay EPE o el tumor ha invadido el cuello de la vejiga.

✓ **T3b:** el tumor ha crecido en la(s) vesícula(s) seminal(es).

T4: el tumor está fijo o está creciendo hacia el interior de estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales, como el esfínter externo, la parte de la capa muscular que ayuda a controlar la micción; el recto; la vejiga, los músculos elevadores o la pared pélvica.

Ganglio (N): La “N” en el sistema de determinación del estadio TNM corresponde a la abreviatura de ganglios linfáticos. Estos órganos minúsculos, con forma de frijol, ayudan a combatir las infecciones. Los ganglios linfáticos que están cerca de la próstata en el área pélvica se denominan ganglios linfáticos regionales. Los ganglios linfáticos ubicados en otras partes del cuerpo se denominan ganglios linfáticos distantes.

NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0 (N más cero): el cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos regionales.

N1: el cáncer se diseminó a uno o varios de los ganglios linfáticos (pélvicos) regionales.

Metástasis (M): La “M” en el sistema TNM indica si el CaP se diseminó a otras partes del cuerpo, como los pulmones o los huesos. Esto se denomina metástasis a distancia.

MX: no se puede evaluar la metástasis a distancia.

M0 (M más cero): la enfermedad no ha hecho metástasis.

M1: hay metástasis a distancia.

- ✓ **M1a:** el cáncer se diseminó a uno o varios de los ganglios linfáticos no regionales o distantes.
- ✓ **M1b:** el cáncer se diseminó a los huesos.
- ✓ **M1c:** el cáncer se diseminó a otra parte del cuerpo, con o sin diseminación al hueso.

Los médicos asignan el estadio del cáncer combinando las clasificaciones T, N y M. Los estadios también incluyen el nivel del PSA y el grupo de grado de Gleason.

Estadio I: el cáncer en este estadio inicial, normalmente, tiene un crecimiento lento. El tumor no se puede palpar y comprende la mitad de un lado de la próstata o incluso menos que eso. Los niveles del PSA son bajos. Las células cancerosas están bien diferenciadas, lo que significa que se ven como células sanas (cT1a–cT1c o cT2a o pT2, N0, M0, el nivel del PSA es menor a 10, grupo de grado 1).

Estadio II: el tumor se encuentra solo en la próstata. Los niveles del PSA son medios o bajos. El CaP en estadio II es pequeño pero puede tener un mayor riesgo de crecer y diseminarse.

- ✓ **Estadio IIA:** el tumor no se puede palpar y comprende la mitad de un lado de la próstata o incluso menos que eso. Los niveles del PSA son medios y las células cancerosas están bien diferenciadas (cT1a–cT1c o cT2a, N0, M0, el nivel del PSA está entre 10 y 20, grupo de grado 1). Este estadio también incluye tumores más grandes limitados a la próstata en la medida que las células cancerosas estén bien diferenciadas (cT2b–cT2c, N0, M0, el nivel del PSA es menor a 20, grupo 1).
- ✓ **Estadio IIB:** el tumor se encuentra solo dentro de la próstata y puede ser lo suficientemente grande para palparse durante el DRE. El nivel del PSA es

medio. Las células cancerosas están moderadamente diferenciadas (T1–T2, N0, M0, el nivel del PSA es menor a 20, grupo de grado 2).

- ✓ **Estadio IIC:** el tumor se encuentra solo dentro de la próstata y puede ser lo suficientemente grande para palparse durante el DRE. El nivel del PSA es medio. Las células cancerosas están moderadamente o escasamente diferenciadas (T1–T2, N0, M0, el nivel del PSA es menor a 20, grupo de grados 3-4).

Estadio III: los niveles del PSA son altos, el tumor está creciendo o el cáncer es de grado alto. Todos estos signos indican un cáncer localmente avanzado que es propenso a crecer y diseminarse.

- ✓ **Estadio IIIA:** el cáncer se diseminó más allá de la capa externa de la próstata hacia los tejidos adyacentes. Es posible que también se haya diseminado a las vesículas seminales. El nivel del PSA es alto. (T1–T2, N0, M0, el nivel del PSA es de 20 o más, grupo de grados 1-4).
- ✓ **Estadio IIIB:** el tumor ha crecido fuera de la glándula prostática y puede haber invadido las estructuras cercanas, como la vejiga o el recto (T3-T4, N0, M0, cualquier PSA, grupo de grados 1-4).
- ✓ **Estadio IIIC:** las células cancerosas del tumor están escasamente diferenciadas, lo que significa que se ven muy diferentes de las células sanas (cualquier T, N0, M0, cualquier PSA, grupo de grado 5).

Estadio IV: el cáncer se ha diseminado fuera de la próstata.

- ✓ **Estadio IVA:** el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales (cualquier T, N1, M0, cualquier PSA, cualquier grupo de grado).
- ✓ **Estadio IVB:** el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos distantes, a otras partes del cuerpo o a los huesos (cualquier T, N0, M1, cualquier PSA, cualquier grupo de grado).

Recurrente: el CaP recurrente es aquel que reaparece después del tratamiento. Puede reaparecer en la región prostática o en otras partes del cuerpo. Si el cáncer regresa, se realizará otra serie de pruebas para obtener información sobre el alcance de la recurrencia.

Esas pruebas y exploraciones a menudo son similares a aquellas que se realizan al momento del diagnóstico original.

La eliminación de los andrógenos testiculares por castración quirúrgica o química en muchos casos da lugar a la regresión de CaP. Sin embargo, también está el CaP que continúa creciendo a pesar del hecho de que la terapia hormonal, el estado más avanzado del CaP, el cual es denominado independiente de andrógenos o resistente a la castración (CRPC), que se presenta cuando el cáncer recurre pese a este tratamiento, es de muy mal pronóstico y casi invariablemente hacen metástasis a hueso y finalmente causa la muerte (Grossmann, Huang, and Tindall 2001, Shen and Abate-Shen 2010).

El CRPC se puede presentar como un aumento continuo de los niveles séricos del PSA, la progresión de la enfermedad, o la aparición de nuevas metástasis (Ryan et al. 2006, Yu, Gulati, et al. 2010). Se considera que existe recurrencia bioquímica cuando aquel paciente que ha sido tratado mediante prostatectomía radical presenta dos valores consecutivos de PSA $>0,2\text{ng/mL}$ y en el caso de que haya sido tratado mediante radioterapia, cuando se constata elevación mantenida del PSA en tres medidas consecutivas, y se ha relacionado esta etapa con un peor pronóstico (Pound et al. 1999). Los mecanismos que generan el desarrollo progresivo de la resistencia a los andrógenos se desconoce, y este es un problema central en el manejo de cada paciente en particular, por lo que una mayor investigación en esta área puede nominar objetivos terapéuticos clave.

3.1.7 Factores pronósticos

Según la guía de cáncer de próstata de la “American Society of Clinical Oncology” ((ASCO) 2018), además del estadio clínico, la Red Nacional Integral sobre el Cáncer (National Comprehensive Cancer Cancer Genome Atlas Research Network, NCCN) y la Universidad de California, San Francisco-Evaluación del riesgo de CaP (UCSF-CAPRA, por sus siglas en inglés) han establecido grupos de riesgo a fin de planificar el mejor tratamiento y predecir el éxito que este tendrá.

- **NCCN:**

La NCCN utiliza el método D’Amico, o clasificación de riesgo pre-quirúrgico para medir el riesgo de una recaída bioquímica a 5 años, el cual propone 4 categorías de grupos de

riesgo sobre la base del nivel de PSA, el tamaño de la próstata, los hallazgos de la biopsia con aguja y el estadio del cáncer,. Conforme más bajo sea su riesgo, más baja será la probabilidad de que el CaP crezca y se disemine.

- ✓ **Riesgo muy bajo.** El tumor no puede sentirse durante un DRE y no se observa durante las pruebas por imágenes, pero se detectó durante una biopsia con aguja (T1c). El PSA es menor a 10 ng/mL. La puntuación de Gleason es de 6 o menos. El cáncer se detectó en menos de 3 muestras obtenidas durante una biopsia profunda. El cáncer se encontró en la mitad o menos de las biopsias profundas.
- ✓ **Riesgo bajo.** El tumor se clasifica como T1a, T1b, T1c o T2a . El PSA es menor a 10 ng/mL. La puntuación de Gleason es de 6 o menos.
- ✓ **Riesgo intermedio.** El tumor tiene 2 o más de estas características:
 - Se clasifica como T2b o T2c.
 - El PSA se encuentra entre 10 y 20 ng/mL.
 - Tiene una puntuación de Gleason de 7.
- ✓ **Riesgo alto.** El tumor tiene 2 o más de estas características:
 - Se clasifica como T3a.
 - El nivel de PSA es superior a 20 ng/mL.
 - Tiene una puntuación de Gleason de entre 8 y 10.
- ✓ **Riesgo muy alto.** El tumor tiene esta dos características:
 - Se clasifica como T3b o T4.
 - El patrón principal de crecimiento celular es GL5 o existen más de 4 biopsias profundas con puntuaciones de Gleason de entre 8 y 10.

- **Puntuación de Evaluación de Riesgo de CaP de UCSF**

La puntuación UCSF-CAPRA (por sus siglas en inglés, *cancer of the prostate risk assessment*) predice las probabilidades de que el cáncer se propague y el paciente muera. Los puntos se asignan según la edad (<50 (+0) o ≥50 (+1)) y el nivel del PSA al momento del diagnóstico (≤6ng/mL (+0), 6,1-10 (+1), 10,1-20 (+2), 20,1-30 (+3) o >30 (+4)), la puntuación de Gleason de la biopsia ((el patrón primario no es 4 o 5 (+0), el patrón secundario es 4 o 5 (+1), patrón primario es 4 o 5 (+3)), el TNM (T1 y T2 (+0) o T3a (1)) y el porcentaje de biopsias profundas con cáncer (>34%(+0) o ≤34%(+1)). Estas categorías luego se usan para asignar una puntuación entre 0 y 10.

- ✓ La puntuación CAPRA de 0 a 2 indica un riesgo bajo.
- ✓ La puntuación CAPRA de 3 a 5 indica un riesgo intermedio.
- ✓ La puntuación CAPRA de 6 a 10 indica un riesgo alto.

3.1.8 Tratamiento inicial del cáncer de próstata según el estadio

Según la guía del cáncer de próstata de la “American Cancer Society” (ACS 2019), además de los factores pronósticos y las expectativas de vida, las preferencias personales también deben considerarse cuando se analizan las opciones de tratamiento.

Estadio I: Para aquellos hombres que no presentan ningún síntoma de CaP y que tienen edad avanzada u otros problemas médicos graves que pudieran limitar el tiempo de vida, a menudo se recomienda espera en observación o vigilancia activa. Por otro lado, la radioterapia (radiación externa o braquiterapia) o la prostatectomía radical pueden ser opciones para los hombres que desean comenzar el tratamiento. Los hombres más jóvenes y que disfrutan de una buena salud pueden considerar la vigilancia activa (sabiendo que necesitarán posteriormente tratamiento), la prostatectomía radical o la radioterapia (radiación externa o braquiterapia).

Estadio II: Los cánceres en etapa II que no son tratados con cirugía o radiación tienen, con el pasar del tiempo, más probabilidades de propagarse más allá de la próstata y causar síntomas que los cánceres en etapa I.

Al igual que con los cánceres en etapa I, la vigilancia activa es frecuentemente una buena opción para los hombres con cánceres que no producen ningún síntoma y quienes están en edad avanzada o tienen otros problemas médicos graves. La prostatectomía radical y la radioterapia (radiación externa o braquiterapia) también pueden ser opciones apropiadas. Todas las opciones de radiación pueden ser combinadas con varios meses de terapia hormonal si existe una gran probabilidad de recurrencia del cáncer basada en el nivel de PSA y/o puntuación Gleason.

Estadio III: Estos cánceres tienen una probabilidad mayor de recurrir después del tratamiento que los tumores en etapas más tempranas.

Las opciones de tratamiento en esta etapa pueden ser:

- ✓ Radiación con o sin terapia hormonal.
- ✓ Prostatectomía radical en casos seleccionados (a menudo con extirpación de los ganglios linfáticos de la pelvis). Después de este tratamiento se puede administrar radioterapia.
- ✓ Puede que los hombres de edad más avanzada que presenten otros problemas de salud opten por un tratamiento menos agresivo, tal como terapia hormonal (por sí sola) o incluso vigilancia activa.
- ✓ La participación en un estudio clínico de tratamientos más nuevos también es una opción para muchos hombres con CaP en etapa III.

Etapa IV: La mayoría de los cánceres en etapa IV no se pueden curar, pero se pueden tratar. Los objetivos del tratamiento son mantener el cáncer bajo control por tanto tiempo como sea posible y mejorar la calidad de vida de un hombre. Las opciones iniciales de tratamiento pueden incluir terapia hormonal, posiblemente junto con quimioterapia; radioterapia externa; prostatectomía radical en pacientes con cáncer que no se ha propagado a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo, después de este tratamiento se puede administrar radioterapia externa. Cirugía (TURP) para aliviar los síntomas tales como sangrado u obstrucción urinaria; también aplican tratamientos dirigidos a las metástasis en los huesos, tal como denosumab (Xgeva), un bifosfonato como el ácido zoledrónico (Zometa), radiación externa dirigida a los huesos o un radiofármaco como el estroncio-89 o el samario-153 o radio-223; vigilancia activa (para los que son de edad más avanzada o tienen otros problemas de salud graves y no tienen síntomas principales de cáncer), además de la participación en un estudio clínico de tratamientos más nuevos. El tratamiento de CaP en etapa IV también puede incluir tratamientos para ayudar a prevenir o aliviar síntomas, tal como el dolor.

3.2 Carcinogénesis de la próstata

A continuación se muestra una manera esquemática como se da la progresión del CaP partiendo del tejido benigno, pasando por la lesión pre-neoplásica (HGPIN) hasta la aparición de la enfermedad y su posterior diseminación (Figura 3).

El inicio de la carcinogénesis de la próstata implica una combinación de alteraciones moleculares adquiridas y en una menor proporción heredadas (Koochekpour 2011). La lesión precursora del CaP, HGPIN, comparte rearrreglos cromosómicos con el CaP (Hughes et al. 2006, Nupponen and Visakorpi 2000), lo que sugiere un origen común en el cual HGPIN es precursor del CaP (Nonn, Ananthanarayanan, and Gann 2009, Obralic and Kulovac 2011). Tanto HGPIN como el CaP son multifocales, encontrándose que hay focos de HGPIN que coexisten con focos de CaP en el 85% de los casos (De-Torres 2007).

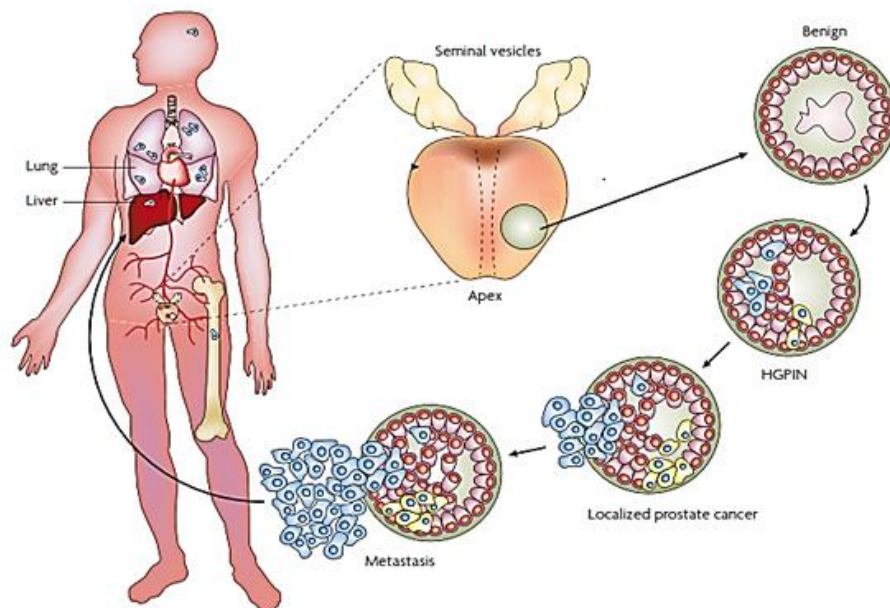


Figura 3. Carcinogénesis en el cáncer de próstata. El crecimiento benigno de la próstata está relacionado con los cambios hormonales, que tienen lugar a medida que el hombre envejece. El tejido benigno puede sufrir alteraciones que conducen a la aparición de la lesión pre-neoplásica HGPIN, que muestra muchas de las características genéticas y morfológicas del CaP, pero carece de invasividad. Algunos HGPIN adquieren la capacidad de invadir, dando lugar a un CaP primario localizado. Por último, el CaP puede propagarse a los ganglios linfáticos o a otras partes del cuerpo (metástasis), lo cual puede conducir a la muerte. Tomado de Kumar-Sinha, Tomlins, and Chinnaiyan 2008.

Alteraciones moleculares heredadas en el CaP generan una predisposición que podría crear un "efecto de campo" (Lochhead et al. 2015, Nonn, Ananthanarayanan, and Gann 2009), en el que una mayor exposición ambiental a carcinógenos químicos y biológicos podría conducir a la formación de múltiples lesiones precursoras (Bostwick et al. 1998, Cheng et al. 1998).

Datos recientes han sugerido que en un paciente dado, un solo clon es responsable para la dispersión de todos los focos metastásicos, lo que sugiere que la identificación del clon "letal" es de suma importancia (Liu et al. 2009, Haffner et al. 2013, Sowalsky et al. 2013), sin embargo, el panorama no es claro en cuanto al CaP primario. Algunos estudios, utilizando el estado la fusión Tmprss2-ERG, han identificado focos con diferente origen clonal (Furusato et al. 2008, Barry et al. 2007) y aunque el peso de la evidencia indica un origen independiente para muchos focos tumorales, la posibilidad de que los tumores espacialmente separados pueden surgir a través de la diseminación intraglandular no ha sido totalmente descartada (Liu et al. 2009, Cheng et al. 1998).

- **Cáncer de próstata resistente a la castración**

No existe un modelo claro de carcinogénesis, pero se conoce con certeza el papel preponderante de los andrógenos en el desarrollo del CaP. Sin embargo, existe el CaP que continúa creciendo a pesar de la ablación de andrógenos, el cual es denominado CaP resistente a la castración (CRPC), de muy mal pronóstico (Grossmann, Huang, and Tindall 2001, Shen and Abate-Shen 2010). Los mecanismos que generan el desarrollo progresivo de la resistencia a los andrógenos se desconoce. Actualmente existen dos modelos para explicar el desarrollo de CRPC, la selección clonal y el de adaptación, y aunque estos dos modelos de progresión son distintos no se excluyen mutuamente (Figura 4).

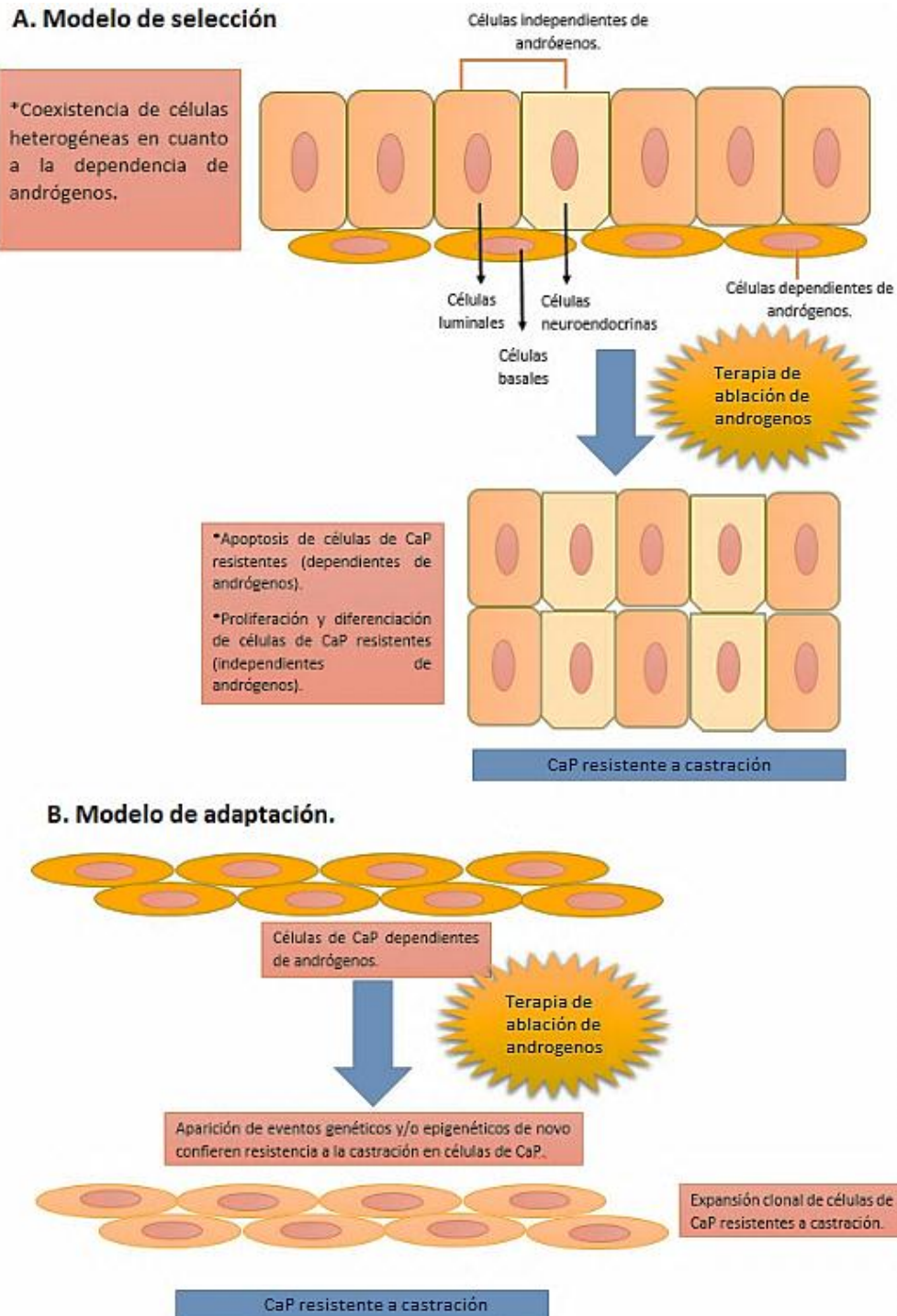


Figura 4. Modelos propuestos en el origen de CaP resistente a castración. A. Modelo de selección. En el modelo de selección cuando hay ablación de andrógenos la mayoría de las células luminales sufren apoptosis, mientras hay un crecimiento de las células basales y las células neuroendocrinas, las cuales son resistentes a la castración. **B.** Modelo de adaptación. Después de la ablación de andrógenos, las células de CaP dependientes de andrógenos adquieren nuevas alteraciones que les permiten pasar de un estado de dependencia de andrógenos a uno de independencia.

✓ **Modelo de selección clonal**

El CaP primario se compone de una mezcla heterogénea de células epiteliales: basales, de secreción luminal y neuroendocrinas. Cuando el paciente se somete a un tratamiento de ablación de andrógenos, la mayoría de las células dependientes de andrógenos (luminales) sufren apoptosis, mientras las células independientes (basales y neuroendocrinas) persisten y sobreviven debido a su bajo requerimiento de andrógenos (Isaacs and Coffey 1981). Es así que, la heterogeneidad de las células del CaP con respecto a su dependencia de andrógenos para la supervivencia y el crecimiento, podría tener sus raíces en la naturaleza intrínseca de la glándula prostática normal (Lawson et al. 2010, Wu et al. 2012).

✓ **Modelo de adaptación**

El modelo de adaptación, a diferencia del de selección, propone que la resistencia a castración no es innata, sino que se produce como una respuesta de las células dependientes de la acción de los andrógenos a sobrevivir por vías alternas con la aparición de novo de eventos genéticos y/o epigenéticos que le confieren resistencia a castración y les permite proliferar de un modo descontrolado. Sin embargo, se desconoce la jerarquía de eventos oncogénicos que impulsan dicha heterogeneidad de respuesta a andrógenos (Grasso et al. 2012 , Taylor et al. 2010, Han et al. 2005).

✓ **Modelo de selección y adaptación coordinados**

La evidencia actual parece estar a favor del modelo de selección; sin embargo, todavía es difícil establecer claramente cualquiera de estos modelos como el mecanismo definitivo o exclusivo. También es posible que ambos modelos contribuyan de forma independiente o cooperativa al crecimiento de CRPC en un paciente. Anteriormente, se había demostrado el papel de las mutaciones de AR en los dos modelos, pero debido a la baja presencia de andrógenos, otras vías de señalización con potencial oncogénico están sobre activadas. El N-Myc y el AKT1 activado son componentes oncogénicos suficientes para transformar las células epiteliales de la próstata humana en CaP neurocrino (Lee et al. 2016).

3.2.1 Rearreglos cromosómicos en cadena como evento genético inicial de la carcinogénesis de la próstata

Los inicios del CaP podrían estar definidos por procesos complejos de reordenamientos cromosómicos que de manera simultánea y coordinada causan la interrupción de los genes supresores de tumores (TSG) y la creación de fusiones oncogénicas, lo cual apoyaría un modelo de evolución puntuada en CaP (Baca et al. 2013).

Las cadenas de reordenamientos cromosómicos pueden clasificarse como: cromotripsis o cromoplexia. Las diferencias entre ambos fenómenos radican en que los puntos de ruptura asociados con la cromotripsis son mucho mayores (cientos) a los de la cromoplexia (decenas), pero en la cromotripsis están agrupados en uno o dos cromosomas, mientras que en la cromoplexia incluyen múltiples cromosomas (Figura 5) (Berger et al. 2011, Stephens et al. 2011, Forment, Kaidi, and Jackson 2012, Baca et al. 2013, Jones and Jallepalli 2012). Algunos reordenamientos estructurales coordinados pueden tener propiedades intermedias de cromotripsis y cromoplexia.

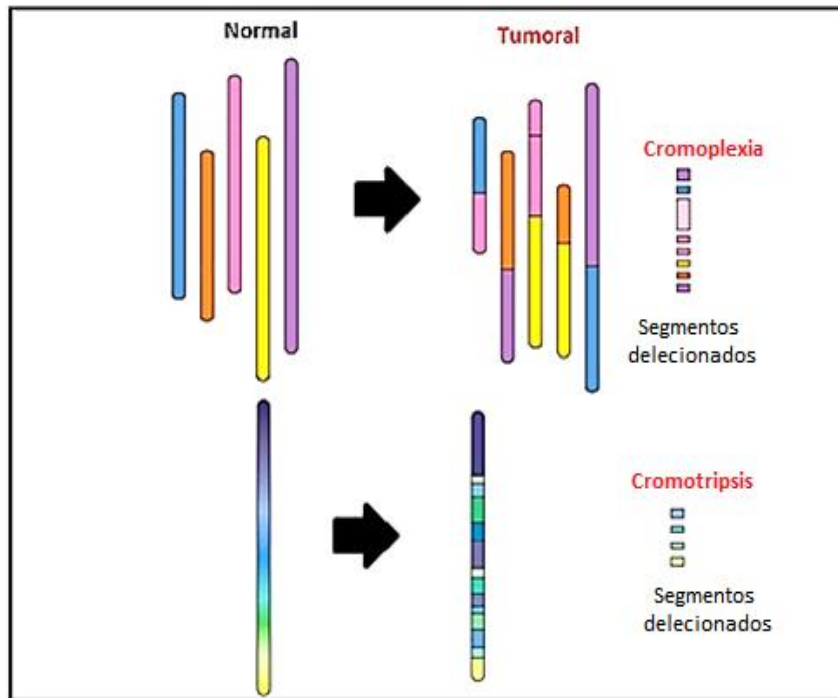


Figura 5. Cromoplexia y cromotripsis. Tanto la cromotripsis como la cromoplexia muestran ruptura aleatoria y fusión de segmentos cromosómicos, pero varían en términos de puntos de ruptura y cromosomas involucrados en los dos fenómenos. Adaptado de Shen 2013.

Dzamba et al., empleando el método estadístico CouGaR identificaron cadenas de rearrreglos cromosómicos en un 63% de los CaP y en un 27% de los cánceres de vejiga analizados, hecho que contrasta con la mayoría de cánceres, donde prácticamente no se encuentran este tipo de alteraciones (Dzamba et al. 2017). Esto es interesante porque se ha reportado que los cánceres de vejiga y cáncer de próstata pueden ser coincidentes (Chun TY 1997).

3.3 Subtipos moleculares en cáncer de próstata

Los CaP de distintos individuos tienen comportamientos biológicos que ayuda a determinar comportamientos clínicos diferentes. Se ha establecido la importancia de los reordenamientos genómicos en CaP. Los eventos de rearrreglos característicos en el genoma de pacientes con CaP podrían influir en la carcinogénesis de la próstata mediante la desregulación simultánea de múltiples genes asociados con cáncer en cromosomas separados, con una interrupción coordinada y simultánea de TSG y la creación de fusiones de oncogenes, que podría estar asociada a la aparición de alteraciones canónicas, asociadas a subtipos moleculares. En los últimos años, los estudios están apuntando hacia la determinación de eventos moleculares excluyentes en la evolución del CaP, que podrían estar representando eventos tempranos y divergentes que direccionan el curso heterogéneo de la enfermedad (Barbieri et al. 2013).

3.3.1 Subtipo ETS(+)

En CaP frecuentemente la fusión de genes conduce a la sobreexpresión de factores de transcripción ETS bajo el control de AREs de TMPRSS2. Los CaP que presentan estos factores de transcripción en genes de fusión son denominados ETS(+). A continuación se muestra una revisión aspectos generales de los ETS.

- **Familia ETS de factores de transcripción**

La familia de factores de transcripción de transformación específica E-26 (ETS) está compuesta por 30 genes identificados, 28 de los cuales se encuentran en el genoma humano. Las ETS son fosfoproteínas con dominios de unión a ADN (dominio ETS) que actúan como activadores o represores de la transcripción. Dicho dominio se compone de 85 aminoácidos que consta de tres hélices α soportadas por una hoja anti-paralela β de cuatro hebras. Esto forma un motivo de hélice-vuelta-hélice alado donde la tercera hélice- α contacta al surco mayor del ADN y le confiere su actividad de enlace al ADN (Adamo and Ladomery 2016).

Los miembros de ETS se subclasifican adicionalmente sobre la base de similitudes de secuencia en el dominio ETS y la presencia de otros dominios conservados (Sharrocks 2001) (Figura 6).

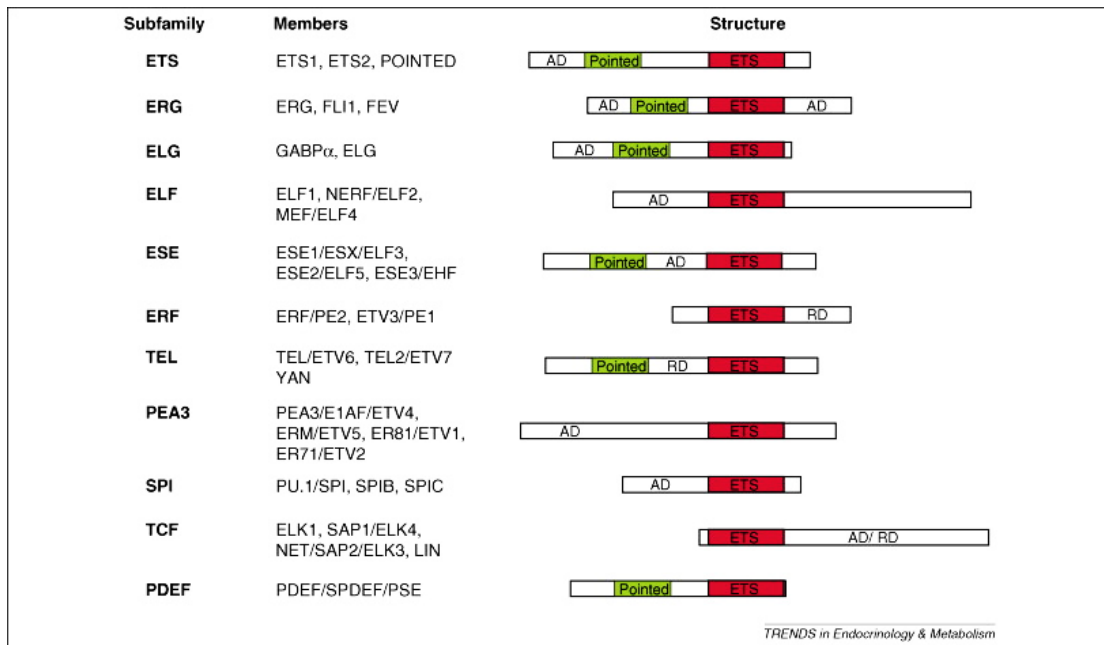


Figura 6. Dominios estructurales característicos de miembros de la familia ETS organizados por subfamilias. AD: dominio de activación transcripcional. ETS: dominio de unión a ADN. Pointed: dominio básico hélice – bucle – hélice. RD: dominio represor transcripcional. Tomado de Gutierrez-Hartmann, Duval, and Bradford 2007.

Un ETS muy importante para el desarrollo y diferenciación de la próstata es ESE3. Se ha encontrado consecuencias similares en el transcriptoma del CaP derivadas de la pérdida

de ESE3 y la sobreexpresión de ERG, y que estos dos factores ETS probablemente podrían actuar en parte, a través de vías moleculares comunes, de forma antagónica para mantener el equilibrio molecular en CaP (Figura 7) (Kunderfranco et al. 2010). Ensayos funcionales apoyan esta hipótesis, ya que la pérdida de ESE3 y la sobreexpresión de ERG, afectan de manera similar las propiedades celulares, como la migración celular y la supervivencia en condiciones independientes del anclaje. Al identificar genes clave que podrían mediar los efectos de los factores de ETS desregulados en CaP, se encontró que la metiltransferasa EZH2 está regulada exclusivamente por la pérdida de ESE3 y la sobreexpresión de ERG, en comparación con la próstata normal, y que a su vez, cuando EZH2 metila a H3K27 conduce a la represión transcripcional del gen supresor de tumores específico de la próstata NKX3.1 (Kunderfranco et al. 2010).

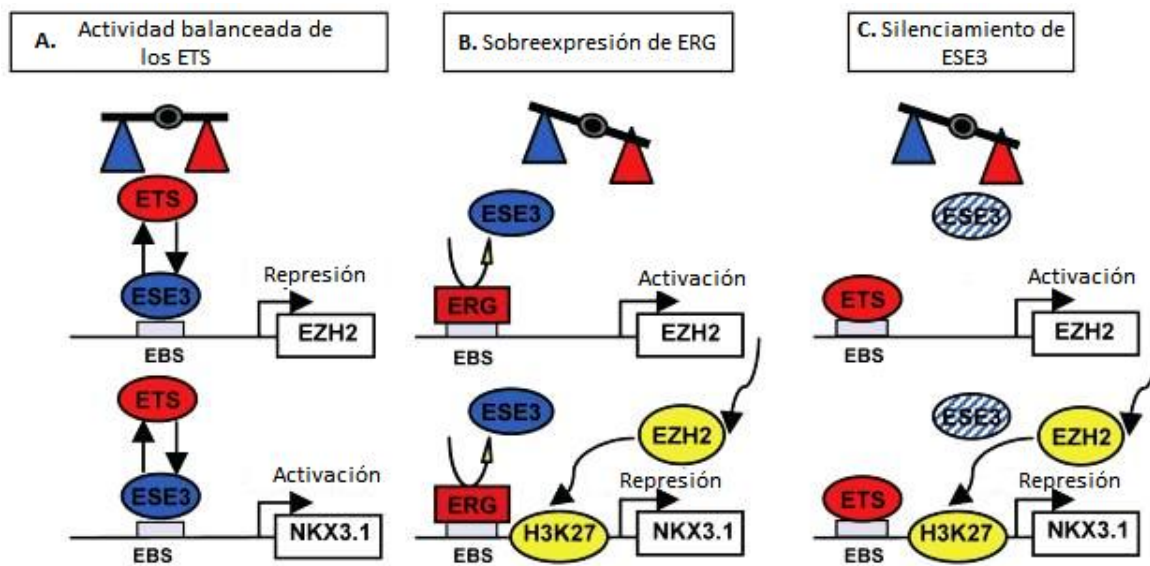


Figura 7. Modelo de la regulación recíproca de EZH2 y NKX3.1 por factores ETS competidores. Se presentan las tres posibles formas en que se da dicha regulación. Mientras que en (A) se puede observar la represión de EZH2 y la activación de NKX3.1 debido al equilibrio de la actividad transcripcional entre diferentes ETS en la regulación del promotor de EZH2, lo cual se da en CaP ETS(-). En (B) ERG desplaza a ESE3 debido a su sobreexpresión y en (C) ESE3 es silenciado, pero con los mismos efectos sobre EZH2 y NKX3.1, que son inversos a los encontrados en casos ETS(-). Tomado de Kunderfranco et al. 2010.

Específicamente en el CaP, el ETS más frecuentemente sobreexpresado es el ya mencionado ERG (ETS-related gene) (Fernández-Serra et al. 2011, Adamo and Ladomery 2016). Este gen se ubica en 21q22.2, está formado por 17 exones que abarcan 300

kilobases y genera, al menos, 9 isoformas por splicing alternativo, de las cuales 7 codifican para proteínas nucleares, de las cuales la más frecuente tiene de 363 residuos. Este gen se expresa en tejidos endoteliales, células hematopoyéticas, riñón y tracto genitourinario. La expresión de ERG disminuye durante el desarrollo vascular normal, pero continúa regulando la pluripotencia de las células madre hematopoyéticas, la homeostasis de las células endoteliales y la angiogénesis. ERG regula la transcripción de las metiltransferasas específicas de la histona 3, pudiendo participar en el silenciamiento epigenético de otros genes (Fernández-Serra et al. 2011, Adamo and Lodomery 2016).

- **Genes de fusión asociados a los ETS en CaP**

Los dos primeros genes de fusión encontrados en CaP, TMPRSS2-ERG y TMPRSS2-ETV1, fueron descubiertos en 2005 por Tomlins et al. Poco después, se identificó TMPRSS2-ETV4. (Tomlins et al. 2005)

Otras fusiones que implican a miembros de la familia ETS que se encuentran en CaP incluyen: HERV_K_22q11.23-ETV1, SLC45A3-ETV1, C15orf21-ETV1, HNRPA2B1-ETV1, KLK2-ETV4, CANT1-ETV4, TMPRSS2-ETV5, SLC45A3-ETV5, SLC45A3-ERG, DDX5-ETV4, FLJ35294-ETV1 y NDRG1-ERG (St John et al. 2012, Hermans et al. 2008).

Estos reordenamientos y translocaciones pueden ocurrir debido a una deleción, como sucede en la fusión TMPRSS2-ERG, así como de una translocación, como con TMPRSS2-ETV4. En el caso de TMPRSS2-ERG, el reordenamiento se produce ya sea por una deleción intersticial de ~ 3 Mb en una sola copia del cromosoma 21, o por una translocación cromosómica. La alta prevalencia de las fusiones TMPRSS2-ERG sugiere que esta región es un punto caliente para los reordenamientos cromosómicos en CaP (St John et al. 2012) (Figura 8).

El TMPRSS2 (serín proteasa transmembrana de tipo II, por sus siglas en inglés), es el principal gen involucrado en las fusiones con los ETS, pero no el único. TMPRSS2 contribuye con la secuencia no traducida promotora en muchos transcritos de genes de fusión específicos de CaP, dando como resultado la sobreexpresión de miembros de la familia de genes ETS (Tomlins et al. 2008).

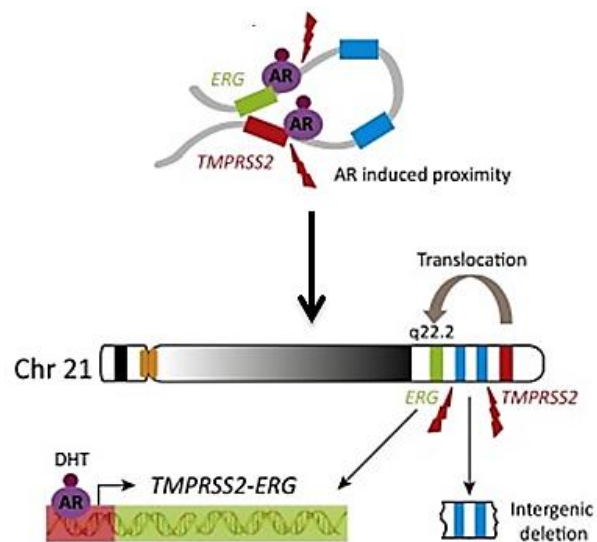


Figura 8. Estructura y origen de gen de fusión TMPRSS2-ERG. La proximidad inducida por el receptor de andrógenos en los genes TMPRSS2 y ERG en el cromosoma 21 favorece las rupturas de ADN de doble cadena inducidas por irradiación gamma, que facilita la aparición de deleciones o translocaciones que dan origen al gen de fusión. Tomado de (Ateeq et al. 2016).

TMPRSS2 está regulada por andrógenos, ya que tiene un elemento de respuesta a andrógenos en su región promotora. La proteína se encuentra en el fluido seminal y está muy expresada en tejido prostático y, en menor medida, en tejido epitelial del colon, estómago, epidídimo y mama. Funcionalmente, al activarse esta proteína el dominio serín-proteasa se libera de la superficie celular al espacio extracelular y activa al receptor G activado por proteasas, el cual desempeña un papel importante en la metástasis del CaP. No obstante, su función no está muy clara, ya que modelos murinos knock-out para TMPRSS2 mostraron un fenotipo normal, lo que parece indicar que se trata de un gen redundante (Fernández-Serra et al. 2011).

Las fusiones TMPRSS2-ERG que conducen a una sobreexpresión de ERG, están presentes en 50% de los casos y se consideran un evento temprano en la carcinogénesis presente desde las lesiones pre-neoplásicas, HGPIN (Barbieri et al. 2012). El ETS más frecuentemente traslocado y estudiado es ERG. Debido a la prevalencia de este tipo de lesiones, los esfuerzos para caracterizar molecularmente el CaP comienza con la división entre los CaP que presentan o no la fusión, denominadas como ETS(+) y ETS(-), respectivamente, especialmente asociados a la fusión TMPRSS2-ERG (Barbieri et al. 2013, Tomlins et al. 2015, Cancer Genome Atlas Research Network 2015).

El TCGA caracterizó cuatro diferentes subtipos ETS(+) según el ETS involucrado en la fusión: ERG, ETV1, ETV4 y FLI1 (Cancer Genome Atlas Research Network 2015). En el principal subtipo, ERG, se encuentra de manera predominante la fusión TMPRSS2-ERG. Aunque TMPRSS2 fue el socio de fusión más frecuente en todas las fusiones ETS, se identificaron fusiones con otros genes regulados por andrógenos previamente descritos, incluyendo SLC45A3 y NDRG1. También se ha encontrado que múltiples ETS pueden estar afectados simultáneamente, de forma coordinada, coexistiendo con TMPRSS2-ERG (Kunderfranco et al. 2010, Esgueva et al. 2010, Hernández et al. 2016, Hernández-Llodrà et al. 2017).

Al ocurrir una fusión génica que coloca los ETS bajo el control de promotores de genes de respuesta a andrógenos, estos se sobreexpresan (Wang et al. 2007), desencadenando una cascada de eventos que incluyen la sobreexpresión de EZH2 (Kunderfranco et al. 2010, Thangapazham et al. 2014). EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) es una proteína metiltransferasa del grupo polycomb (Deb, Thakur, and Gupta 2013). Las proteínas Polycomb son un grupo conservado filogenéticamente, caracterizadas inicialmente en *Drosophila* por su papel crucial como reguladores negativos de los genes homeóticos requeridos para la segmentación. Estas proteínas hacen parte de una familia responsable de la diferenciación celular, mediante su actividad metiltransferasa de de la lisina 27 de la histona 3, que facilita la formación de heterocromatina y el silenciamiento de genes de desarrollo, como NK3 Homeobox 1 (NKX3.1) (Figura 7) (Kunderfranco et al. 2010, Deb, Thakur, and Gupta 2013).

- **Subtipo EZH2 altamente expresado-ERG dependiente**

Se ha encontrado que la expresión de EZH2 generalmente se encuentra regulada de forma dependiente de ERG, pero existen otros mecanismos ERG independientes (Figura 7) (Börno et al. 2012, Varambally et al. 2008, Koh et al. 2011, Sander et al. 2008). La sobreexpresión de EZH2 independiente del mecanismo de origen, se ha asociado con enfermedad agresiva y metastásica (Deb, Thakur, and Gupta 2013, Melling et al. 2015), por lo cual EZH2 como blanco terapéutico ha sido ampliamente estudiado, aunque resaltando que en estos casos es necesario discriminar entre casos ETS(+) y ETS(-), para

determinar una combinación de terapia más adecuada, pese a que ambos tendrían un peor diagnóstico debido a la alta expresión de EZH2 (Tabla 1).

- **Subtipo NKX3.1 bajamente expresado**

NKX3.1 (NK3 Homeobox 1) es un gen supresor tumoral (GST) prostático, con homeodominio regulado por andrógenos cuya expresión proteica se localiza predominantemente en el epitelio prostático normal (Abate-Shen, Shen, and Gelmann 2008). Es un miembro de la subfamilia NK de los genes homeobox, que han sido implicados en los procesos de especificación de destino celular y la organogénesis en muchas especies. Durante el desarrollo murino, Nkx3.1 es el marcador más temprano conocido de la formación de la próstata y continúa expresándose en todas las etapas de la diferenciación de la próstata y en la edad adulta. Nkx3.1 desempeña un papel esencial en el desarrollo normal de la próstata, ya que su pérdida de función conduce a defectos en las secreciones de proteínas prostáticas y en la morfogénesis ductal. Además, la pérdida de función de Nkx3.1 también contribuye a la carcinogénesis de la próstata (Figura 7), ya que los ratones Nkx3.1 mutantes están predispuestos al carcinoma de próstata y la pérdida de función de Nkx3.1 coopera con la de otros genes supresores de tumores en la progresión del cáncer. Además, mediante diversos mecanismos, la expresión de NKX3.1 se reduce en el CaP humano no invasivo y en etapa temprana, lo que sugiere que su disminución de expresión es uno de los primeros pasos en la mayoría de los CaP humanos (Abate-Shen, Shen, and Gelmann 2008, Gurel et al. 2010, Bowen et al. 2000) (Figura 9).

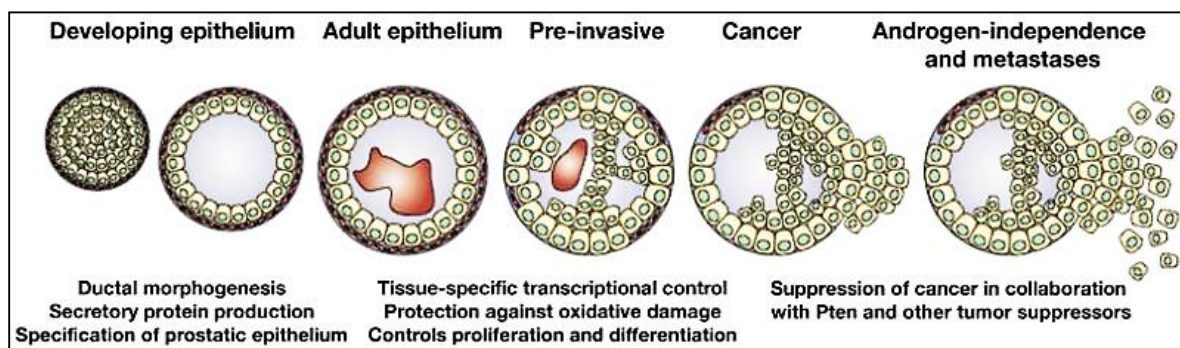


Figura 9. Varios papeles de NKX3.1 en el desarrollo de la próstata, en la próstata adulta normal, y en el cáncer de próstata. Tomado de Abate-Shen et al., 2008.

La pérdida de expresión de NKX3.1 está fuertemente asociada con la enfermedad hormono-refractaria y con un estadio tumoral avanzado en CaP (Bowen et al. 2000, Gurel et al. 2010) y además se asocia a CaP ETS(+) (Kunderfranco et al. 2010, Lapointe et al. 2007)(Figura 7). Lapointe (2007) había sugerido la existencia de un subtipo molecular agresivo asociado a deleciones en la región cromosómica 8p21 (NKX3.1) y de 21q22 (que resulta en fusiones TMPRSS2-ERG), el cual no se ha evaluado ampliamente.

3.3.2 Subtipo ETS(-)

En el CaP ETS(-) se han propuesto mecanismos de progresión independientes de ERG.

- **Subtipo EZH2 altamente expresado-ERG independiente**

En los CaP ETS(-) existen tres mecanismos independientes de ERG que conducen la sobreexpresión del gen EZH2 (Varambally et al. 2008, Börno et al. 2012, Koh et al. 2011, Sander et al. 2008). En primer lugar se encuentra la amplificación del gen de EZH2, la eliminación de su regulador negativo miR-101 y la regulación de EZH2 dependiente de MYC. MYC se une corriente arriba del promotor EZH2 e induce su expresión directamente o de forma indirecta, ya que MYC reprime la transcripción de los genes CTDSPL, CTDSP2 y CTDSP1 que albergan miR-26a1, miR-26a2 y miR-26b, que reprimen la expresión de EZH2, ya que miR-26a y miR-26b no estarían disponibles para desestabilizar el mRNA de EZH2 mediante la unión específicamente al 3'-UTR de EZH2 en el complejo RISC (Deb, Thakur, and Gupta 2013). Börno et al., 2012 también reportaron un marcado subtipo molecular en el cual también se encontró una sobreexpresión de EZH2 pero con una estrecha relación con una baja expresión de miR-26a, independiente de ERG, que se incluye como un subtipo fenotípicamente agresivo en CaP ETS(-).

- **Subtipo SPINK-1 altamente expresado**

Se desconoce cómo el inhibidor de serina peptidasa, Kazal tipo 1 (SPINK-1) contribuye a la carcinogénesis del CaP y la progresión del tumor. Estudios recientes han centrado la atención en la interacción de SPINK-1 y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Shen et al. 2014). SPINK1 y EGF, el ligando de EGFR, comparten 50% de

homología de aminoácidos y varias similitudes estructurales. Similar al EGF, se ha demostrado que SPINK-1 es capaz de fosforilar EGFR y sus moléculas corriente abajo en células de cáncer de páncreas. También se ha propuesto que SPINK-1 funciona al menos en parte para estimular la señalización EGFR en un bucle autocrino. Clínicamente, la noción de eje SPINK1-EGFR se evidenció por la co-sobreexpresión significativa de SPINK-1 y EGFR en una cohorte de pacientes con CaP. Recientemente, se informó de que SPINK-1 induce transición epitelio-mesénquima (EMT) en CaP a través de la activación de EGFR, lo que lleva a un aumento de la capacidad migratoria e invasiva *in vitro*. La vía EGFR / MAPK estaba principalmente involucrada en este proceso (Figura 10). Hay que denotar que, EMT es un programa temprano del desarrollo embrionario y juega un papel crítico en la progresión del cáncer y la metástasis (Shen et al. 2014).

SPINK-1 es una proteína secretada que se sobreexpresa específicamente en un subconjunto de cánceres ETS(-) (Tomlins et al. 2008). La alta expresión atípica de SPINK-1 se ha asociado con un mayor grado de Gleason (Leinonen et al. 2010, Johnson et al. 2016, Paju et al. 2007, Jhavar et al. 2009) y es un predictor independiente de recurrencia bioquímica después de la resección con una disminución de la supervivencia (Tomlins et al. 2008, Ateeq et al. 2011). Sin embargo, la predicción clínica de SPINK-1 es controversial, pues algunos autores dicen que no hay relación con recurrencia bioquímica (Grupp et al. 2013, Lippolis et al. 2013, Flavin et al. 2014).

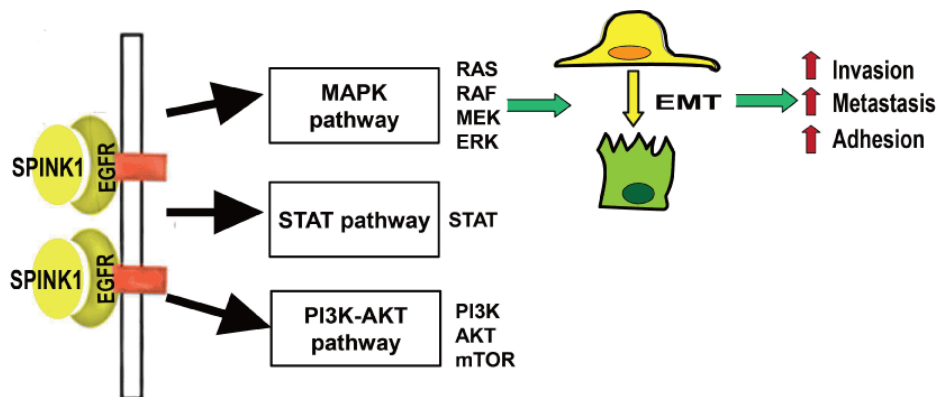


Figura 10. Papel de SPINK-1 en CaP. SPINK1 promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) a través de la vía de señalización EGFR en CaP como factor de crecimiento. SPINK1 se une a EGFR como un factor de crecimiento autocrino. Existen al menos tres vías de señalización en sentido descendente de EGFR, incluidas las vías de señalización PI3K/AKT, JAK/STAT y MAPK/MEK/ERK. Los tres objetivos posteriores están fosforilados por SPINK1 y EGF. Sin embargo, la ruta MAPK/MEK/ERK en realidad está involucrada principalmente en la EMT inducida por SPINK1. Tomado de Shen et al., 2014.

- **Subtipo SPOP mutado/delecciones en CHD1**

SPOP (*por sus siglas en inglés*, Speckle-type Poz Protein) es un componente de un complejo de ubiquitina-proteína ligasa BCR (BTB-CUL3-RBX1) basado en cullin-RING que media la ubiquitinación de proteínas diana, llevando con mayor frecuencia a su degradación proteasomal. Curiosamente, todas las mutaciones SPOP descritas hasta ahora afectan a los residuos evolutivamente conservados en el dominio estructuralmente definido de MATH de unión al sustrato. Las mutaciones SPOP asociadas al cáncer se acompañan a menudo de elevación en los niveles de sus proteínas sustrato (Duan and Pagano 2015).

Las mutaciones recurrentes en el gen de la proteína SPOP definen otro subtipo molecular ETS(-), que ocurren en hasta un 15% de los CaP y se ha evidenciado también en HGPIN (Barbieri et al. 2012, Blattner et al. 2014), junto con las delecciones de CHD1, con una frecuencia de 57,9% de las muestras SPOP mutadas (Blattner et al. 2014). Las mutaciones del gen SPOP también se encuentran asociadas a casos ETS(-) (Blattner et al. 2014, Cancer Genome Atlas Research Network 2015). La presencia de mutaciones en SPOP conducen a un peor pronóstico en pacientes con un tiempo de vida inferior transcurrido hasta la progresión bioquímica en comparación con aquellos que no tienen mutaciones SPOP (García-Flores et al. 2014). La expresión de SPOP se correlaciona inversamente con la puntuación de Gleason; bajos niveles de SPOP predicen independientemente un peor pronóstico tanto para la progresión bioquímica como para la clínica (metástasis).

- **Pérdida bialélica de CDK12**

La pérdida bialélica de CDK12 se excluye mutuamente con tumores que están caracterizados por deficiencia de reparación de ADN, fusiones ETS y mutaciones SPOP (Wu et al. 2018). La pérdida de CDK12 está enriquecida en CRPC en relación con la enfermedad clínicamente localizada y se caracteriza por duplicaciones focales en tándem que conducen a un aumento de las fusiones de genes y una marcada expresión diferencial de genes. Las duplicaciones focales en tándem asociadas con la pérdida de CDK12 dan como resultado ganancias altamente recurrentes en los loci de los genes involucrados en el ciclo celular y la replicación del ADN. Los casos de mutantes CDK12 son diploides basales y no muestran firmas mutacionales de ADN vinculadas a defectos en la

recombinación homóloga. Los casos de mutantes CDK12 se asocian con una carga elevada de neoantígenos resultante de los marcos de lectura abiertos quiméricos inducidos por la fusión y el aumento de la infiltración de células T tumorales de expansión clonal. La inactivación de CDK12 define una clase distinta de CRPC que puede beneficiarse de la inmunoterapia por inhibición del punto de control inmunitario (Wu et. al, 2018).

3.3.3 Subtipos propuestos por el TCGA

El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) para CaP, caracterizó 333 tumores, analizando la presencia de mutaciones, fusiones de genes, alteraciones del número de copias somáticas (SCNA), expresión génica y metilación del ADN (Cancer Genome Atlas Research Network 2015). Con estos resultados, 74% de los CaP se pudieron clasificar en siete subtipos moleculares basados en la presencia de alteraciones “conductoras” de oncogénesis. Cuatro de los siete subtipos corresponden a distintas fusiones cromosómicas que involucran diferentes miembros de la familia ETS, llamados subtipos ETS(+): con alta expresión de ERG, ETV1, ETV4 y FLI1, mientras que los tres subtipos restantes llamados ETS(-) se caracterizan por la presencia de mutaciones génicas (SPOP, FOXA1 e IDH1) y la ausencia de esta fusión (Figura 11). El TCGA encontró el subtipo SPOP mutado en un 11% y de manera interesante lo encontró generalmente asociado al incremento en la expresión de SPINK. Estudios anteriores habían reportado la sobreexpresión SPINK como un subtipo independiente, pero en estos trabajos no se habían evaluado mutaciones en el gen SPOP de manera simultánea (Fontugne et al. 2016, Tomlins et al. 2008).

El 26% restante de tumores no clasificados por el TCGA, podrían haber evolucionado a partir de anomalías moleculares de baja frecuencia aún no evidenciadas o podrían corresponder a tumores con características moleculares de diferentes subtipos. Sin embargo, pese a que este es el estudio más representativo de clasificación del CaP, otros estudios han caracterizado algunos subtipos que concuerdan con lo encontrado por el TCGA pero con potencial como blancos terapéuticos, que serán detallados más adelante.

- **Subtipo FOXA1 mutado**

Este subtipo se ha encontrado en el 3% de los CaP. La proteína Forkhead box protein A1 (FOXA1), es necesaria para la diferenciación de células epiteliales en la próstata, modula la transcripción por AR y las mutaciones podrían afectar su unión al ADN, y promover la progresión del ciclo celular en el CRPC (Barbieri et al. 2012). Curiosamente, en el estudio del TCGA, el mRNA, las SCNA y los perfiles de metilación de los tumores con mutaciones en SPOP, fueron similares a los que tenían mutaciones en FOXA1 (Cancer Genome Atlas Research Network 2015).

Es controversial si las mutaciones FOXA1 representan un subtipo diferente, con una prevalencia de tan solo 3% para el TCGA, o si las mutaciones en FOXA1 harían parte del subtipo SPOP-SPINK (Barbieri et al., 2012). Algunos de los tumores a los que no se les identificó subtipo en el TCGA, eran genómicamente similares a los tumores mutantes SPOP y FOXA1 pero carecían de dichas mutaciones canónicas.

- **IDH1 mutado**

La presencia de mutaciones en el proto-oncogen isocitrate dehydrogenase 1, IDH1, ha sido descrito como un nuevo subtipo de CaP que se encuentra en el 1% de los casos (Mauzo et al. 2014, Cancer Genome Atlas Research Network 2015). IDH1 codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa cuya función es la producción de NADPH y α -cetoglutarato a partir de isocitrato. Las mutaciones de ganancia de función de IDH1 activan una nueva función enzimática para la producción del oncometabolito 2-hidroxiglutarato (R-2-HG), a partir del α -cetoglutarato, lo que conduce a la hipermetilación del DNA y al aumento de la angiogénesis mediante la inhibición de la transcripción inducible por el factor de hipoxia 1 α 2 (Horbinski 2013, Showalter et al. 2017). Este subtipo se caracteriza por niveles muy elevados de hipermetilación de DNA de todo el genoma y por un mayor número de genes silenciados epigenéticamente (Mauzo et al. 2014, Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Noushmehr et al. 2010).

- **Sin Subtipo identificado**

El 26% de los tumores en el estudio del TCGA no fueron clasificados en subtipos. Dentro de estos CaP se encuentran mutaciones específicas en los genes TP53, KDM6A y KMT2D o SCNAs (Somatic copy number alterations) que involucran MYC y CCND1. Estos CaP fueron clínica y genómicamente heterogéneos (Cancer Genome Atlas Research Network 2015), algunos presentan muchas SCNA y altas puntuaciones de Gleason indicativas de un peor pronóstico; aproximadamente un tercio de ellos eran genómicamente similares a los subtipos SPOP y FOXA1, mientras otros con puntuaciones de Gleason baja (GS 6) tenían menos alteraciones genómicas, como SCNA y patrón de metilación del DNA similar al del tejido normal. La figura 11 resume los posibles subtipos encontrados en el CaP:

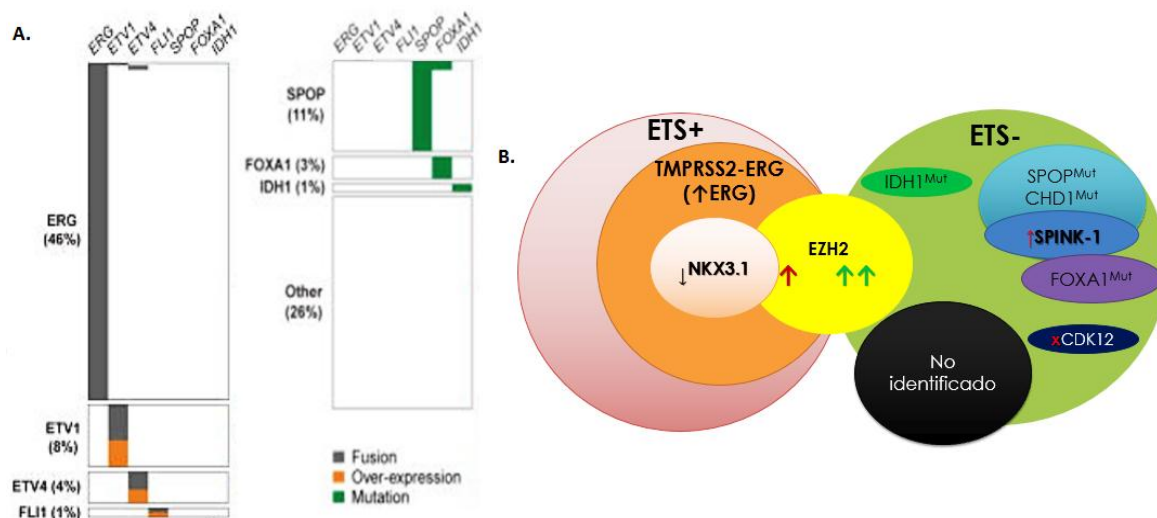


Figura 11. Integración de los subtipos de CaP de diferentes estudios. . A. La taxonomía del CaP propuesta por el TCGA, revela siete subtipos definidos por fusiones ETS (ERG, ETV1, ETV4 y FLI1) o mutaciones en SPOP, FOXA1, y IDH1. B. Esquema de integración de los subtipos de CaP de diferentes estudios. Debido a su alta prevalencia, los CaP se clasifican en ETS(+) o ETS(-). La baja expresión de NKX3.1 presentan una relación con casos ETS(+). Por otro lado, los casos que no presentan dichas fusiones (ETS-) se han asociado a SPOP-CHD1^{Mut}, que a su vez para el TCGA se han asociado con una alta expresión de SPINK-1. También se pueden ver casos en los que FOXA1 o IDH1 se encuentren mutados. El subtipo de pérdida bialélica de CDK12 se presenta con una cruz roja. Se resalta el papel central de EZH2, puesto que su sobreexpresión se ve representada en casos ETS(+) (flecha roja) y ETS(-), pero con niveles más altos en los ETS(-) (doble flecha verde). Sin embargo existen casos que no tienen las alteraciones canónicas de ningún tipo de subtipo planteado, por lo que a estos casos se le denominó subtipo no identificado. Las flechas representan los niveles de expresión de los genes mencionados. Tomado de Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015.

3.3.4 Valor pronóstico y predictivo de la clasificación del cáncer de próstata en subtipos moleculares

La Tabla 1 resume los subtipos de CaP, resaltando los diferentes resultados que se han obtenido en cuanto al significado pronóstico de forma independiente de los biomarcadores asociados a cada subtipo estudiado y los avances en estudios terapéuticos específicos con blancos asociados a cada subtipo, resaltando el uso del EZH2 alterado como blanco terapéutico en combinación con los diferentes subtipos anteriormente postulados, puesto que ya se encuentra en estudios preclínicos la inhibición de su actividad de metiltransferasa (Graça et al. 2016).

Se excluye el subtipo de FOXA1 de la Tabla 1, teniendo en cuenta que éste comparte patrones similares de metilación del DNA, de SCNAs y de expresión génica con el subtipo SPOP (Cancer Genome Atlas Research Network 2015), causando alteraciones similares en la célula para provocar cáncer, y que estos subtipos mostraron los niveles más altos de expresión génica mediada por AR, sugiriendo posibles usos preventivos y terapéuticos similares dirigidos a los andrógenos.

Tabla 1. Significado clínico-patológico del estudio de los subtipos moleculares en CaP.

Subtipo molecular (Prevalencia en CaP)		Pronóstico	Tratamientos específicos
EZH2 (61%)	EZH2 [↑] /NKX3. 1 [↓] /ETS(+) (30%)	Fenotipo metastásico por aumento de la migración celular y anoikis (Lapointe et al. 2007, Yu, Mani, et al. 2010, Zoma et al. 2017, Bowen, Zheng, and Gelmann 2015, Leinonen et al. 2013, Kunderfranco et al. 2010). PTEN ^{Mut} se ha asociado con un mayor PG y una menor sobrevida libre de enfermedad (Leinonen et al. 2013, Hernández-Llodrà et al. 2017, Gao et al. 2016, Silva et al. 2016, Lotan et al. 2016).	Dirigidos a EZH2 (DZNep). Otros métodos como la inhibición de HDAC y DNMT, ya que estos facilitan también el silenciamiento epigenético mediado por EZH2 (Yang and Yu 2013). La inhibición directa de ERG es difícil, el bloqueo de la función de co-factores reguladores de ERG, como PARP1, es más factible (Brenner et al. 2011, Williamson and Cheng 2011).
	EZH2 [↑] /ETS(-) (31%)	Similares a EZH2/ETS(+), pero con peor pronóstico (Leinonen et al. 2013, Melling et al. 2015).	DZNep e inhibición de HDAC y DNMT (Yang and Yu 2013).
SPOP ^{Mut} /SPINK-1 ^{↑*} (11%)		PG alto asociado con un peor pronóstico por recurrencia bioquímica o clínica (metástasis) (García-Flores et al., 2014; Jhavar et al., 2009; Leinonen et al., 2013; Paju et al., 2007; Yun et al., 2017).	Dirigidos a los sustratos de SPOP que no están siendo degradados: RA y SRC-3; este se encuentra en estudio en modelos animales (Lu et al. 2015, Ferraldeschi et al. 2015, Geng et al. 2014).

	La mutación germinal sin sentido en SPOP (N296I) se asocia al CaP hereditario (Zuhlke et al. 2014).	Mab anti-SPINK-1 (Ateeq et al. 2011, Stenman 2012).
IDH1 ^{Mut} (1 %).	La mutación de IDH1 es rara pero se ha asociado a aparición temprana (Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Ghiam et al. 2012). Muy pocos pacientes para extraer conclusiones significativas (Cairns and Mak 2013).	Es de interés su estudio como blanco terapéutico Bloqueo de la producción o efectos posteriores de la D-2-hidroxi-glutarato y agentes hipometilantes (Mondesir et al. 2016).
Perdida bialélica de CDK12 (6,9%)	Asociado con CPRC. Los pacientes presentan carga elevada de neoantígenos resultante de los marcos de lectura abiertos quiméricos inducidos por la fusión y el aumento de la infiltración de células T tumorales de expansión clonal (Wu et al. 2018).	Inmunoterapia por inhibición del punto de control inmunitario (inhibidor anti-PD1) (Wu et al. 2018).

*: Frecuentemente asociado con sobreexpresión de SPINK-1, la pérdida de proteínas MAP3K7 y CHD1. *DZNep*: 3-deazaneplanocina-A, HDAC: Histonas deacetilasas, DNMT: DNA methyltransferase, *Mab anti-SPINK-1*: Monoclonal antibody raised against a partial recombinant SPINK-1.

3.4 Heterogeneidad inter e intratumoral en Cáncer de Próstata

El CaP se caracteriza por presentar una representativa heterogeneidad de tipo inter como intratumoral, haciendo difícil el pronóstico del paciente, pues no se ha logrado diferenciar de manera eficiente aquellos pacientes con enfermedad agresiva de los que poseen enfermedad indolente (Figura 12). La presencia de múltiples focos en el CaP de un mismo individuo hace posible la existencia de múltiples clones con alteraciones moleculares diferentes, que pueden estar asociadas con diferentes comportamientos biológicos y que dificultan predecir el comportamiento clínico del CaP.

3.4.1 Análisis de multiclonalidad en Cáncer de próstata

Aunque está claro que el CaP es una enfermedad multifocal, no queda claro si los focos tumorales pueden surgir de clones independientes y, en caso afirmativo, en qué medida la heterogeneidad molecular y patológica entre estos clones es un factor determinante de la historia natural de la enfermedad. También existe heterogeneidad tanto en cada paciente como entre diferentes pacientes. Varios estudios han demostrado que las metástasis tumorales anatómicamente distintas se derivan de un único clon progenitor, sin embargo,

no sucede lo mismo con los CaP primarios. Datos recientes han sugerido que, en un paciente dado, un solo clon es responsable para la dispersión de todos los focos metastásicos, lo que sugiere que la identificación del clon "letal" es de suma importancia (Liu et al. 2009, Haffner et al. 2013, Sowalsky et al. 2013).

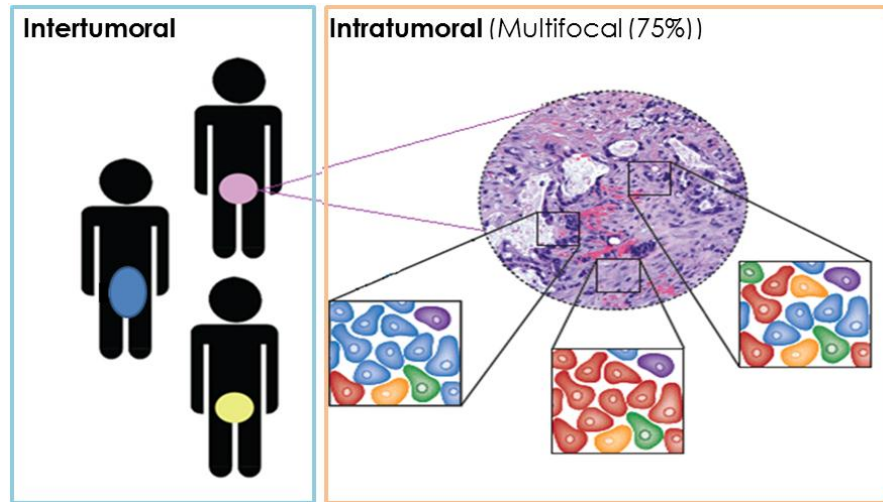


Figura 12. Niveles de heterogeneidad en cáncer de próstata. La heterogeneidad intertumoral se refiere a la diferencia de comportamiento biológico y clínico entre los diferentes pacientes, mientras que la heterogeneidad intratumoral, está influenciada por la presencia de multifocalidad en CaP, encontrándose diferentes comportamientos biológicos entre los diferentes focos de cada paciente, que dificultan el pronóstico y manejo clínico de la enfermedad. Modificado de (Allison and Sledge 2014).

Varios hallazgos de la considerable heterogeneidad entre focos de un mismo paciente con CaP resaltan las limitaciones de las herramientas de clasificación disponibles basadas en la premisa del uso del tumor índice. Debido a la multifocalidad del CaP, no es sencillo establecer subtipos moleculares, ya que diferentes focos de un mismo paciente podrían presentar diferentes subtipos.

Algunos estudios han utilizado como prueba molecular de la multiclonalidad, el estado de la fusión TMPRSS2-ERG (por FISH o inmunohistoquímica como un sustituto) para identificar focos espacialmente distintos con diferente origen clonal, teniendo en cuenta la consecuente sobreexpresión de ERG en la mayoría de los casos. Dichos estudios han encontrado resultados discordantes con respecto a la presencia de dicho marcador en diferentes focos de un mismo paciente (Minner et al. 2013, Boutros et al. 2015, Cooper et al. 2015, Wei et al. 2017). Cuando se compararon diferentes focos tumorales individuales

de pacientes sometidos a prostatectomía con respecto a la delección de PTEN, se encontró heterogeneidad entre y dentro de los focos tumorales separados (Yoshimoto et al. 2013). También se ha evaluado la discordancia molecular entre diferentes focos de un mismo paciente a partir de la expresión por inmunohistoquímica de la pareja molecular, que podría estar representando una subclase molecular del CaP, SPINK-1/ERG, encontrándose diferente origen clonal en el 25% de los casos (Fontugne et al. 2016).

El poder de la secuenciación completa del genoma (WGS) reside en su capacidad para proporcionar el catálogo completo de alteraciones, muchas de las cuales son invisibles para otras tecnologías, especialmente los puntos de corte involucrados en reordenamientos de cadena equilibrados, que pueden alterar múltiples genes relacionados con el cáncer (Barbieri et al. 2013). Por eso, dicha tecnología ha sido de importante relevancia en el estudio de la multiclonalidad del CaP en los últimos años. En este campo se resaltan los estudios de Boutros et al. (2015), Cooper et al. (2015) y Wei et al. (2017), quienes han encontrado una filogenia multiclonal a partir de la discordancia intratumoral e intertumoral a nivel de alteraciones de todo el genoma. De especial interés son los resultados obtenidos por Wei et al. (2017), ya que reveló una variabilidad considerable dentro y entre los focos del CaP al estudiar los niveles de expresión de los genes de los kits diagnósticos Decipher, Prolaris y Oncotype DX, junto con la actividad del AR (evaluada de acuerdo a la expresión de 20 genes blanco del AR), mutaciones somáticas, SCNA, la expresión génica y las fusiones génicas. En general, este estudio evidenció que la correlación de los valores de los test comerciales entre diferentes focos de CaP en un individuo es baja y no se correlaciona con la taxonomía molecular propuesta por el TCGA.

Aunque el peso de dicha evidencia indica un origen independiente para muchos focos tumorales, la posibilidad de que los tumores espacialmente separados pueden surgir a través de la diseminación intraglandular no ha sido totalmente descartada (Liu et al. 2009, Cheng et al. 1998). Bajo este panorama, se hace necesario analizar la clonalidad en distintos focos con diferentes grados de lesión en un mismo paciente, incluyendo focos de HGPIN, en una muestra de mayor tamaño y mediante la concordancia de diferentes marcadores moleculares, que involucren los distintos caminos de progresión que podría llevar un tumor, para la identificación de posibles subtipos moleculares (Fontugne et al. 2016, Wei et al. 2017), lo cual es clave para dilucidar cada vez mejor el proceso de carcinogénesis de la próstata.

4. Metodología

4.1. Diseño del estudio

Estudio exploratorio descriptivo observacional, transversal retrospectivo.

4.2 Muestras utilizadas en el estudio

4.2.1 Definición de sujetos de estudio

Se estudiaron 20 pacientes con CaP. Para cada paciente se analizaron cuatro/seis muestras tomadas de bloques de parafina de diferentes focos de la próstata de diferentes grados de lesión de CaP (el CaP primario según la escala de Gleason), provenientes del proyecto base desarrollado en el Instituto Nacional de Cancerología-ESE “Exploración de potenciales biomarcadores predictores del pronóstico en pacientes con diagnóstico de Cáncer de Próstata (CaP)”

Criterios de inclusión:

- ✓ Casos con diagnóstico confirmado de cáncer de próstata.
- ✓ Casos sometidos a prostatectomía radical.
- ✓ Casos con disponibilidad de múltiples bloques (mínimo 2 por grado de lesión) de FFPE con presencia de tejido no tumoral, HGPIN y CaP (GL3-GL5).
- ✓ Casos con ganglios positivos y/o recurrencia bioquímica (peores pronósticos del estudio, de acuerdo a las historias clínicas).

Criterios de exclusión:

- ✓ Casos con insuficiente material para el procesamiento.
- ✓ Bloques de mala calidad para el procesamiento.

Se contaba con bloques FFPE y sus respectivas láminas, para la determinación por el patólogo de los puntos de los cuales la histopatóloga obtuvo los respectivos “punch” (pequeño trozo de tejido que se extrae utilizando una aguja de 2 mm de espesor). Se obtuvieron entre 3-4 punch por microdissección de cada una las zonas seleccionadas por bloque, de acuerdo a disponibilidad de material para su posterior procesamiento.

4.2.2 Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra para el presente estudio es de conveniencia debido a que aún no se puede hacer un cálculo por desconocer la frecuencia de estas alteraciones en CaP en la población colombiana. En total se procesaron 103 muestras, provenientes de 20 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

4.2.3 Controles

- **Tejido fresco congelado**

Como control positivo de la fusión TMPRSS2-ERG se obtuvieron muestras de tejido fresco congelado conservado a -70°C en gel Tissue-Tek (Ted Pella Inc., USA/ Canadá) provenientes de prostatectomías radicales de dos pacientes con diagnóstico de CaP, con puntuación de Gleason 3+3, del Banco Nacional de Tumores Terry Fox (BNTTF) del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia.

- **Línea celular PC3**

PC3 es una línea celular derivada de CaP independiente de andrógenos, es negativa para las fusiones, sobreexpresa EZH2 y no tiene expresión de NKX3.1, por lo cual se empleó como control negativo durante la estandarización. Esta línea fue amablemente cedida por el profesor Fabio Aristizábal de la Universidad Nacional de Colombia. Las condiciones de cultivo fueron 5 % de CO₂ a 37°C, en medio DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y un coctel compuesto de penicilina, estreptomina y anfotericina B al 1 %.

4.3 Descripción de las intervenciones

Este estudio es retrospectivo, y por lo tanto, no se realizaron intervenciones en pacientes.

4.4 Procedimientos

4.4.1 Extracción y cuantificación de RNA a partir de tejido FFPE

El RNA fue aislado a partir de cuatro *punch* mediante una extracción automatizada en el equipo QIAcube (QIAGEN, Hilden, Alemania), usando un protocolo modificado del kit comercial AllPrep DNA/RNA FFPE (QIAGEN, Hilden, Alemania). La modificación consistió en la incubación de la muestra antes de empezar el protocolo automatizado con proteinasa K a 56°C durante tres horas, en lugar 15 min. Se empezó por la desparafinización mediante el protocolo en el cual el xilol se mezcla a 56°C por media hora con la muestra como disolvente de la parafina seguido de dos pasos de lavado con etanol para hidratar el tejido. Posteriormente se preparó la muestra para la extracción automatizada, siguiendo las recomendaciones del fabricante consignadas en el protocolo estándar del equipo para el uso del kit mencionado. Dicho protocolo aparece en la web en la URL: <https://www.qiagen.com/us/qiacube/standard/protocolview.aspx?StandardProtocolID=975>. El RNA se cuantificó mediante el uso del fluorómetro Qubit® 2.0 para RNA HS (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) obteniéndose la concentración (ng/μL) por muestra. El RNA se guardó a -70°C hasta su uso.

4.4.2 Análisis de presencia/ausencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG

A partir de 40 ng (10ng/μL) de RNA se realizó la RT-PCR para determinar la presencia del gen de fusión con el exón 1 de TMPRSS2-ERG y el exón 4 de ERG), empleando el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA) y los iniciadores que se presentan en la Tabla 2. La RT-PCR se llevó a cabo con un volumen final de 20μL, compuesto de 10μL de KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal, 0,4μl de 50X KAPA RT Mix, 2μl de cada par de iniciadores, 4μl de muestra de RNA (10ng/μl) y 1,6μl de agua libre de nucleasas. Se usó el termociclador PTC-200 PCR

System (MJ Research, Reno, Nevada, EUA) para variar la temperatura de anillamiento, usando las demás temperaturas de termociclaje propuestas por el fabricante. El protocolo empieza con la transcripción reversa a 42 °C por 5 min durante un ciclo; la activación de la enzima reversa a 95°C por 3 minutos durante un ciclo; la denaturación de las muestras a 95°C por 10 segundos, las temperaturas de anillamiento por 20 segundos para cada transcrito de la Tabla 2 y la extensión a 72°C por 1 segundo durante 45 ciclos (protocolo disponible en URL: <https://www.kapabiosystems.com/product-applications/products/qpcr-2/sybr-fast-one-step/>).

Tabla 2. Iniciadores utilizados en el estudio para los diferentes ensayos de RT-PCR y qRT-PCR con sus respectivas condiciones óptimas estandarizadas.

Transcrito	Iniciadores	Tamaño (pb)	Concentración final de los iniciadores	Temperatura de anillamiento (°C)	Referencia
ERG	F: TCTTGGACCAACAAGTAGCC	151	150 nM	63°C	Saramäki et al., 2008
	R: GTCGGGATCCGTCATCTTG				
TMPRSS2:ERG (exón1:exón 4)	F: TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG	125	100 nM	61°C	Tomlins et al., 2005
	R: GTAGGCACACTCAACAACGACTGG				
EZH2	F: TGT GGA TAC TCC TCC AAG GAA	90	250 nM	55°C	Börno et al., 2012
	R: GAG GAG CCG TCC TTT TTC A				
NKX3.1	F: CCGAGACGCTGGCAGAGA	81	200 nM		Richter et al., 2007
	R: GAAGGGCGCCTGAAGTGTT				
SPINK-1	F: CAAAAATCTGGGCCTTGCTGAGAAC	62	200 nM		Tomlins et al., 2008
	R: AGGCCTCGCGGTGACCTGAT				
UBC	F: ATT TGG GTC GCG GTT CTT G	133	150 nM		Vandesompele et al., 2002
	R: TGC CTT GAC ATT CTC GAT GGT				

F: Forward. R: Reverse.

La determinación de la presencia/ausencia de las fusiones TMPRSS2-ERG fue realizada por la visualización de los amplímeros correspondientes en geles de agarosa al 2% con SYBR safe.

4.4.3 Análisis de expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1

A partir de 40 ng de RNA extraído se llevó a cabo una qRT-PCR en un solo paso con el uso del kit comercial modificado qScript 1-Step SYBR Green qRT-PCR (Quanta Biosciences, Cummings Center, Beverly, MA), empleando los iniciadores descritos en la tabla 2, para ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1. La qRT-PCR se llevó a cabo con un volumen final de 20 μ L, compuesto de 10 μ l de One-Step SYBR Green Master Mix (2X), 0,4 μ l de qScript One-Step RT, 2 μ l de cada par de iniciadores, 4 μ l de muestra de RNA (10ng/ μ l) y 1,6 μ l de agua libre de nucleasas. Las condiciones de termociclaje empleadas fueron las establecidas por los proveedores, con excepción de la temperatura de anillamiento, que fue establecida usando el termociclador PTC-200 PCR System (MJ Research, Reno, Nevada, EUA) para variar la temperatura de anillamiento en la estandarización, mientras que en la elaboración de las curvas y la qRT-PCR con las diferentes muestras se usó el termociclador LightCycler® 480 (Roche Life Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany). El protocolo de termociclaje empieza con la transcripción reversa a 50°C por 10 minutos durante un ciclo; la activación de la enzima reversa a 95°C por 5 minutos durante un ciclo; la denaturación de las muestras a 95°C por 10 segundos, las temperaturas de anillamiento por 20 segundos para cada transcrito de la Tabla 2 y la extensión a 72°C por 1 minuto (donde se leían los resultados) durante 45 ciclos. Para las curvas de fusión la PCR se puso a 95°C por 5 segundos, 65°C por un minuto, a 97°C de forma continua con 5 – 10 adq/°C y un enfriamiento a 40°C por 10 segundos.

La temperatura de anillamiento y la concentración de los iniciadores fueron establecidas por la estandarización, siendo específicas de cada transcrito (Tabla 2). Como gen de expresión constitutiva se usó UBC. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

- **Elaboración de las curvas estándar**

La construcción de los estándares, para cada uno de los genes analizados, se realizó a partir de una muestra FFPE de tejido no tumoral adyacente de próstata, excepto para SPINK-1 que se usó una muestra FFPE de paciente con CaP GL 4. Se utilizaron las mismas condiciones estandarizadas para la RT-PCR, usando el termociclador

LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche, Basilea, Suiza), omitiendo el paso de activación de la retrotranscriptasa, ya que en este caso se estaba partiendo de cDNA.

Posterior a la RT-PCR, los amplímeros fueron purificados del gel de agarosa mediante el kit comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) y se cuantificó mediante el uso del fluorómetro Qubit® 2.0 para DNA High Sensitivity (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). El cálculo del número de copias del *stock* de cDNA se realizó usando la calculadora online de URI-Genomics and Sequencing-Center, 2004 (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Para la curva de calibración se realizaron 7 diluciones seriadas, por duplicado, entre 1×10^7 a 1×10^1 de número de copias/ μL . La eficiencia de la amplificación obtenida al realizar la curva estándar (E), fue el parámetro utilizado para valorar su validez en cada corrida de análisis de expresión de las muestras. E se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. La Eficiencia E=1,903 para UBC, E=1,873 para EZH2, E=2,003 para NKX3.1 y E=1,904 para SPINK-1 con desviaciones estándar <0,2 respecto a los duplicados de los diferentes puntos tomados en cuenta para cada curva.

La validez de los puntos, los cálculos de eficiencias y errores en el equipo se hicieron por el método de la segunda derivada. El algoritmo matemático en el que se basa este método en el software de Roche (Penzberg, Upper Bavaria, Germany) no está publicado, pero es posible al ajustar modelos de curvas sigmoidales y polinomiales, con una alta significación ($p < 0,001$) y un coeficiente de correlación ($r > 0,99$).

- **Gen de referencia**

Para controlar las variaciones experimentales en la cantidad de RNA utilizado en cada qRT-PCR y las variaciones de lote a lote en los reactivos de PCR, se ha utilizado la medición coincidente de los llamados genes de referencia para la normalización de los datos de expresión de genes diana. Sin embargo, los estudios que han comparado la expresión de varios de estos genes han demostrado invariablemente que sus niveles de expresión difieren dramáticamente entre los tejidos, por ejemplo, entre tejido normal vs neoplásico, puesto que tienen una tasa de proliferación diferente. Para estudios más

generalizados, la variabilidad en los niveles de expresión de varios genes de referencia comúnmente usados ha significado que no hay un gen de "talla única" que pueda usarse para la normalización de los datos de expresión génica. En consecuencia, individualmente estos genes son generalmente inadecuados como controles de expresión, y si se usan para normalizaciones en diferentes tejidos, se pueden introducir errores significativos, por esto es necesaria la elección de uno adecuado de acuerdo al estudio.

Los análisis de la expresión del gen de referencia UBC con las muestras FFPE permitieron verificar la integridad del RNA para los posteriores análisis de expresión de los genes blanco, siendo UBC un buen gen de referencia para este estudio, puesto que se encontraron valores de CPs y de generación de número de copias que no varían significativamente entre los diferentes tipos lesión de muestras FFPE evaluadas.

UBC representa un gen de ubiquitina, la ubiquitina C. La proteína codificada es un precursor de la poliubiquitina. La conjugación de monómeros o polímeros de ubiquitina puede llevar a varios efectos dentro de una célula, dependiendo de los residuos con los que se ubica la ubiquitina. La ubiquitinación se ha asociado con la degradación de proteínas, la reparación del ADN, la regulación del ciclo celular, la modificación de la quinasa, la endocitosis y la regulación de otras vías de señalización celular (encontrado en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7316>).

- **Método de Pfaffl para determinar la expresión relativa de ERG, EZH2, SPINK-1, NKX3.1**

La cuantificación relativa se calculó como una relación de niveles de cada molécula blanco dividido por los niveles de UBC. Las unidades usadas para expresar niveles de mRNA cuantitativos relativos son arbitrarias. Se incluyeron diluciones estándar en cada corrida para permitir un cálculo preciso de las eficiencias de amplificación dentro de cada experimento individual, lo que representa cualquier efecto de la matriz (es decir, la variación del día a día o de muestra a muestra) y permite una cuantificación relativa más precisa. Esto también permitió el cálculo preciso de la variación inter-ensayo entre las diferentes ejecuciones. Todos los resultados descritos en el estudio se refieren a los datos cuantitativos relativos de los niveles de expresión de los genes ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1 normalizados a UBC. El uso del método de cuantificación relativa requiere que

las eficiencias de PCR de todos los genes bajo investigación sean similares y lo más cerca posible al 100% para garantizar la amplificación exponencial de la plantilla, sin embargo, esto no se cumple en todos los casos. Por lo tanto, fue necesario evaluar las eficiencias de amplificación para los genes diana y el gen de referencia en un amplio rango dinámico del ensayo de cinética de la PCR, por esta razón se utilizó el método de Pfaffl, en lugar del popular $2^{\Delta\Delta CP}$, para determinar la eficiencia real de cada gen, ya que asumir una eficiencia de 2 podría llevar a una sobreestimación o subestimación.

Con la eficiencia encontrada en las curvas estándar de los genes blanco y de UBC, y los CP determinados a partir de la cuantificación absoluta realizada por el equipo, se realizó expresión relativa utilizando el método de Pfaffl (Pfaffl 2001), el cual utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \left[\frac{E_{ref}^{CP_{ref} \text{ Muestra}}}{E_{targ}^{CP_{targ} \text{ Muestra}}} \right] \div \frac{E_{ref}^{CP_{ref} \text{ Calibrador}}}{E_{targ}^{CP_{targ} \text{ Calibrador}}}$$

Donde E corresponde a la eficiencia de la curva para el gen correspondiente, CP es el ciclo umbral (por sus siglas en inglés Crossing point), Ref es el gen de referencia, $Targ$ es el gen blanco y el Calibrador es el tejido no tumoral adyacente.

4.5 Plan de análisis

4.5.1 Variables a analizar

- **Clasificación histológica de los focos y presencia de ganglios: Variable categórica.**

Categorías:

1. Tejido adyacente no tumoral: Tejido control y calibrador.
2. HGPIN: Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado.
3. Gleason 3
4. Gleason 4
5. Gleason 5
6. Ganglios

- **Translocación TMPRSS2-ERG:** Variable categórica.

Categorías:

- TMPRSS2 exón 1:ERG exón 4 positiva (Presencia).
- TMPRSS2 exón 1:ERG exón 4 negativa (Ausencia).
- **Niveles de expresión de los transcritos de ERG, EZH2, SPINK-1 y NKX3.1 normalizadas con el gen casero y el tejido control:** Variables continuas.

Para los análisis de la expresión relativa de los diferentes genes, los valores obtenidos fueron convertidos en tres categorías: altamente expresados $>1,20$, normalmente expresados $0,80-1,20$ son tomados como expresión normal, $<0,80$ como bajamente expresados.

Inicialmente se valoró si cada alteración molecular tenía discordancia entre los diferentes focos evaluados de cada paciente. Posteriormente se hizo el análisis para todos los pacientes con respecto a las 4 alteraciones. Para los análisis de concordancia en las alteraciones moleculares por paciente solo aquellos que presentaran patrones similares de forma totalmente homogénea para la detección de la fusión TMPRSS2-ERG, la expresión de EZH2, NKX3.1 y SPINK-1 fueron determinados con la categoría concordante. Los casos que presentaban alteraciones que no eran concordantes en todos los focos neoplásicos de un paciente, pero a los cuales se les podría atribuir la discordancia a la evolución de la enfermedad (aparición temprana o tardía) y no al origen clonal, se les llamó parcialmente concordantes. Finalmente, se les llamó discordantes a los que no presentaban un patrón homogéneo en todos sus focos, sin presentar patrones de evolución molecular de las alteraciones.

4.5.2 Análisis estadístico

Se analizaron los datos obtenidos por las categorías que definen los diagnósticos histopatológicos del estudio, es decir la lesión pre-neoplásica HGPIN, y las lesiones de tejido tumoral (diferentes grados de Gleason, GL3-GL5, y ganglios). Se calcularon las medianas de cada uno. Se verificó que los datos no cumplían con el criterio de normalidad

en cada grupo de diagnóstico histopatológico a partir del uso del Test Shapiro-Wilk, y al transformar con Log_2 cumplían con la normalidad pero no con el supuesto de homogeneidad de varianzas de acuerdo al Test de Levene, por lo que se verificaron diferencias significativas por grupos con las cinco alteraciones moleculares evaluadas en el estudio (fusión TMRSS2-ERG, la expresión de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1) con el paquete estadístico SPSS, con el Test no paramétrico Kruskal-Wallis, el cual arrojó que solo los niveles de expresión de NKX3.1 tenían diferencias significativas en relación con el grado de lesión. De acuerdo a los resultados obtenidos por Kruskal-Wallis, posteriormente se aplicó una comparación pareada entre los diferentes grupos de grado de lesión para identificar los grupos que presentaban las diferencias estadísticas con el Test U de Mann-Whitney con un $p > 0,05$, también con SPSS. Los resultados se visualizaron de acuerdo a la distribución de medianas y la dispersión de los datos, analizados en una escala logarítmica Log_2 con un diagrama de cajas y bigotes con el uso del paquete estadístico de RStudio.

4.6 Consideraciones éticas

De acuerdo a la resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos (Min Salud 1993), Artículo 11, este proyecto se clasifica como “INVESTIGACIÓN SIN RIESGO”. El proyecto se realizará con muestras obtenidas para un proyecto Institucional base en curso “EXPLORACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES PREDICTORES DEL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA (CaP)” el cual, al trabajar con bloques de parafina almacenadas en el archivo de patología, también se catalogó como sin riesgo por el Comité de Ética e Investigaciones del INC. La información sobre recurrencia bioquímica y presencia de ganglios fue tomada de las bases de datos del proyecto base. Por lo tanto, no se tuvo, ni se tendrá contacto con los pacientes. Al ser un estudio planteado para trabajar con material de archivo, es sin riesgo y no se necesitó consentimiento informado.

5.Resultados

A continuación, se presentarán los resultados en el orden de los objetivos.

5.1. Primer objetivo

El primer objetivo desarrollado es el siguiente:

Identificar los niveles de expresión de NKX3.1, EZH2, SPINK-1 y ERG, además de determinar la presencia/ausencia del gen de fusión TMPRSS2- ERG, en tejido sano, HGPIN y tumoral, en diferentes focos de tejidos de próstata de pacientes con cáncer.

5.1.1. Detección de fusiones TMPRSS2-ERG

Para la detección de la fusión TMPRSS2-ERG se utilizaron las condiciones de RT-PCR consignadas en la sección de metodología, utilizando el protocolo de estandarización previamente establecido (Segura y Serrano, 2016). La figura 13 ejemplifica la forma en que se obtuvieron los resultados de detección de las fusiones por medio de RT-PCR.

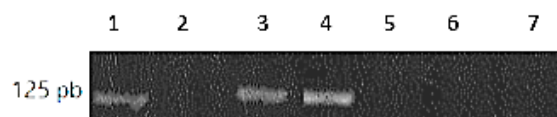


Figura 13. Detección del gen de fusión TMPRSS2-ERG. Gel de agarosa al 2,0%. 1: Control positivo (Tejido fresco de CaP). 2: Control negativo (Línea PC3). 3-6: Muestras FFPE de diferente grado de lesión del paciente 1. 3: GL3. 4:GL4. 5: No tumoral adyacente. 6: HGPIN. 7: Blanco.

Al establecer la presencia de las fusiones en las 103 muestras analizadas de 20 pacientes (focos de tejido adyacente no tumoral (n=20), HGPIN (n=17), GL3 (n=23), GL4 (n=23), GL5 (n=7) y ganglios (n=13)), se encontró que ninguno de los 20 tejidos control (tejido

adyacente no tumoral) presentaron la fusión. Dentro de los 83 focos neoplásicos, se encontró que 28 focos tenían la fusión evaluada y 55 no (34% vs 66%). Se hará el análisis detallado por grado de lesión en el objetivo cuatro para esta y las otras alteraciones moleculares que se describirán a continuación.

5.1.2 Análisis de expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1

Inicialmente se determinaron las condiciones óptimas de la RT-PCR para cada gen blanco, ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1, y el gen de referencia, UBC. Con el amplímero obtenido con dichas condiciones se realizó la curva estándar para cada gen evaluado. A partir de comparación de las curvas de fusión de los estándares con las curvas de las muestras FFPE, se corroboró que la expresión obtenida si correspondía al gen evaluado, por lo cual aquellas muestras cuyas curvas de fusión tenían un pico inespecífico se consideraron negativas para la expresión del gen. Se determinó la expresión del gen de referencia, UBC, para analizar así la calidad del RNA de las muestras FFPE y para normalizar la expresión de cada gen. Finalmente, a partir de la eficiencia y los CPs de cada muestra, se llevó a cabo el cálculo de la cuantificación relativa de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología por el método de Pfaffl (Pfaffl 2001).

- **Expresión del gen de referencia-UBC**

Inicialmente se determinaron las condiciones óptimas de la RT-PCR del gen de referencia, UBC, para lo cual se realizó un gradiente de concentración de iniciadores entre 50-200nM (Figura 14A) y un gradiente de temperatura de anillamiento entre los 55-63°C (Figura 14B), encontrándose que las condiciones óptimas de concentración de iniciadores fue 150nM y una temperatura de anillamiento de 55°C. A partir de las condiciones obtenidas por RT-PCR se obtuvo la curva estándar (Figura 14C), con CPs entre 25,29 y 33,65 (mediana=29,61, media= 29,68), evidenciándose valores similares de expresión de UBC en las 103 muestras de estudio. Se muestran las curvas de fusión obtenidas de las muestras comparadas con los estándares, identificando la especificidad de los amplímeros (Figura 14D).

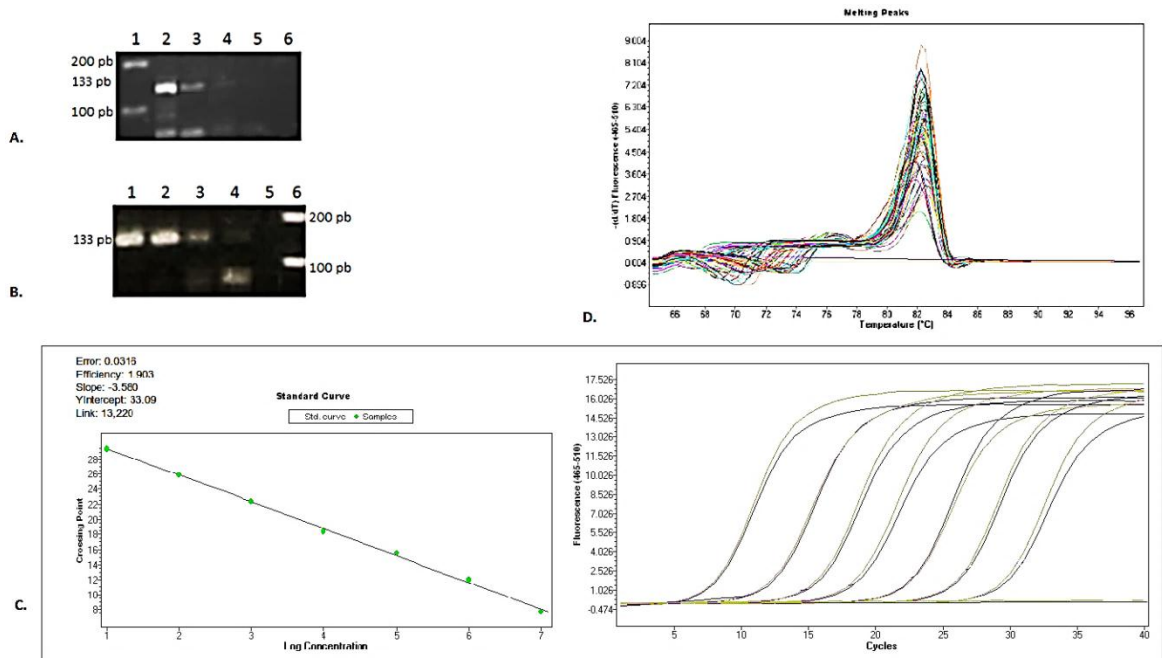


Figura 14. Estandarización de los análisis de expresión absoluta de UBC en las muestras FFPE. A. Gradiente de concentración de iniciadores de UBC (Temperatura de anillamiento: 63°C; tejido no tumoral adyacente de FFPE). 1: Marcador de peso molecular. 2: 200 nM. 3: 150 nM. 4: 100 nM. 5: 50 nM. 6: Blanco. **B.** Gradiente de temperatura de anillamiento de iniciadores de UBC (Concentración de iniciadores: 150nM; tejido no tumoral adyacente de FFPE). 1: Marcador de peso molecular. 2: 55°C. 3: 58°C. 4: 61°C. 5: 63°C. 6: Blanco. **C.** Curva estándar. La curva estándar con siete puntos, entre 1×10^7 a 1×10^1 de número de copias/ μ L presentó una eficiencia de 1,903 con CPs entre 7,68-29,36. **D.** Curvas de fusión de muestras FFPE y estándares.

- **Análisis de expresión relativa de ERG**

Se determinaron las condiciones óptimas de la RT-PCR a partir de tejido no tumoral adyacente de FFPE, para lo cual se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento entre los 60-66°C (Figura 15A) y un gradiente de concentración de iniciadores entre 50-200nM (Figura 15B), encontrándose que las condiciones óptimas estandarizadas fueron 63°C de temperatura de anillamiento y una concentración de iniciadores de 150nM. A partir de las condiciones obtenidas por RT-PCR se obtuvo la curva estándar para ERG (Figura 15C). A partir de la curva de UBC y la curva de ERG, se obtuvieron los datos necesarios para normalizar la expresión de las muestras y finalmente se obtuvo la expresión relativa respecto al tejido calibrador (tejido no tumoral adyacente), utilizando la metodología de Pfaffl descrita en la sección de metodología. De las 103 muestras, 20 eran las muestras calibrador, por lo que los resultados de expresión se muestran en las 83 muestras

restantes, las cuales tienen origen neoplásico. Se muestran las curvas de fusión obtenidas de las muestras comparadas con los estándares (Figura 15D).

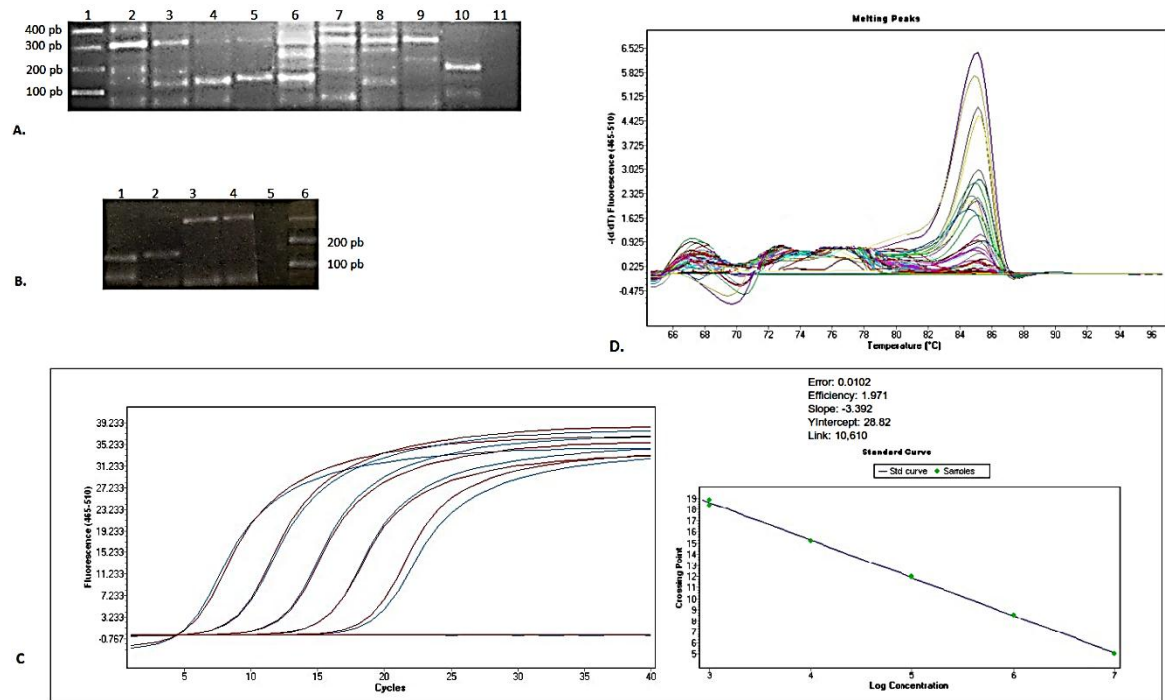


Figura 15. Estandarización de los análisis de expresión relativa de ERG en las muestras FFPE. A. Gradiente de temperatura de anillamiento (Concentración de iniciadores de 200 nM; tejido no tumoral adyacente de FFPE). 1: Marcador de peso molecular. 2: 60°C. 3: 60,6°C. 4: 62,1°C. 5: 63°C. 6: 64°C. 7: 64,4°C. 8: 64,9°C. 9: 65,5°C. 10: 66°C. 11: Blanco. **B.** Gradiente de concentración de iniciadores (Temperatura de anillamiento de 63°C; tejido no tumoral adyacente de FFPE). 1: 200 nM. 2: 150 nM. 3: 100 nM. 4: 50 nM. 5: Blanco. 6: Marcador de peso molecular. **C.** Curva estándar. La curva estándar cuenta con cinco puntos, entre 1×10^7 a 1×10^3 número de copias/ μL , con una eficiencia de 1,971 con CPs entre 5,00 y 18,60. **D.** Curvas de fusión de muestras FFPE y estándares.

Los valores de expresión relativa de ERG presentaron un rango entre 0,00 y 719,75 con una mediana de 5,71. De los 83 focos neoplásicos 49 tuvieron alta expresión (59%), 31 baja expresión (37%) y 3 expresión normal (4%), siendo predominante la alta expresión de ERG.

- **Análisis de expresión relativa de EZH2**

Se empezó por determinar las condiciones óptimas de la RT-PCR a partir de tejido no tumoral adyacente de FFPE, para lo cual se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento entre los 55-63°C (Figura 16A) con una concentración de iniciadores de 250nM, puesto que se hizo un montaje inicial a 60°C con 200nM con una muestra de FFPE y no se detectó señal (datos no mostrados), encontrándose que las condiciones óptimas estandarizadas fueron 55°C de temperatura de anillamiento y una concentración de iniciadores de 250nM. Se muestran la curva estándar de EZH2 (Figura 16B) y las curvas de fusión obtenidas de las muestras comparadas con los estándares (Figura 16C).

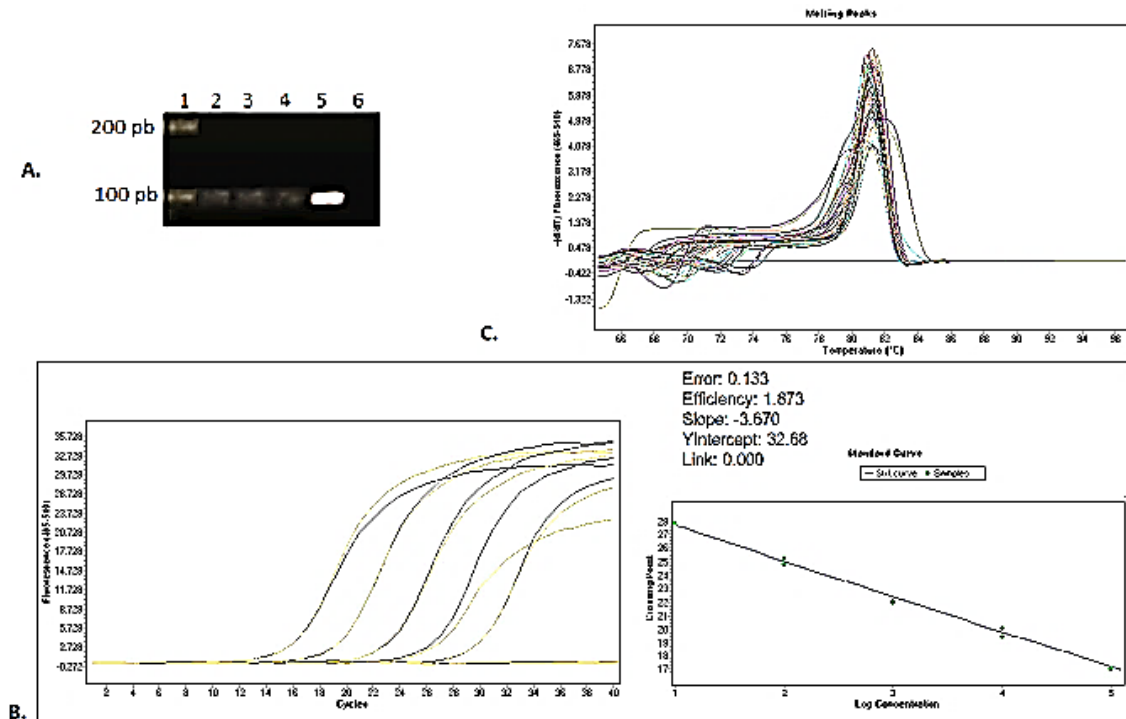


Figura 16. Estandarización de los análisis de expresión relativa de EZH2 en las muestras FFPE. A. Gradiente de temperatura de anillamiento (Concentración de iniciadores de 250 nM; tejido no tumoral adyacente de FFPE). 1: Marcador de peso molecular. 2: 63°C. 3: 61°C. 4: 58°C. 5: 55°C. 6: Blanco. **B.** Curva estándar. Curva estándar de cinco puntos, entre 1×10^5 a 1×10^1 de número de copias/ μ L, con una eficiencia de 1,873 con CPs entre 12,61 y 29,63. **C.** Curvas de fusión de muestras FFPE y estándares.

Los valores de expresión relativa de EZH2 presentaron un rango entre 0,01 y 191,10 con una mediana de 0,59. De los 83 focos tumorales 45 tuvieron alta expresión (54%), 33 baja

expresión (40%) y 5 expresión normal (6%), siendo predominante la alta expresión de EZH2.

- **Análisis de expresión relativa de NKX3.1**

Se realizó la RT-PCR con una temperatura de anillamiento de 55°C y una concentración de iniciadores de 200nM, a partir de una muestra de sangre y una de tejido no tumoral adyacente de FFPE, detectándose la banda esperada con la muestra de FFPE (Figura 17A). En la figura 18, se muestran la curva estándar de NKX3.1 (Figura 17B) y las curvas de fusión obtenidas de las muestras comparadas con los estándares (Figura 17C).

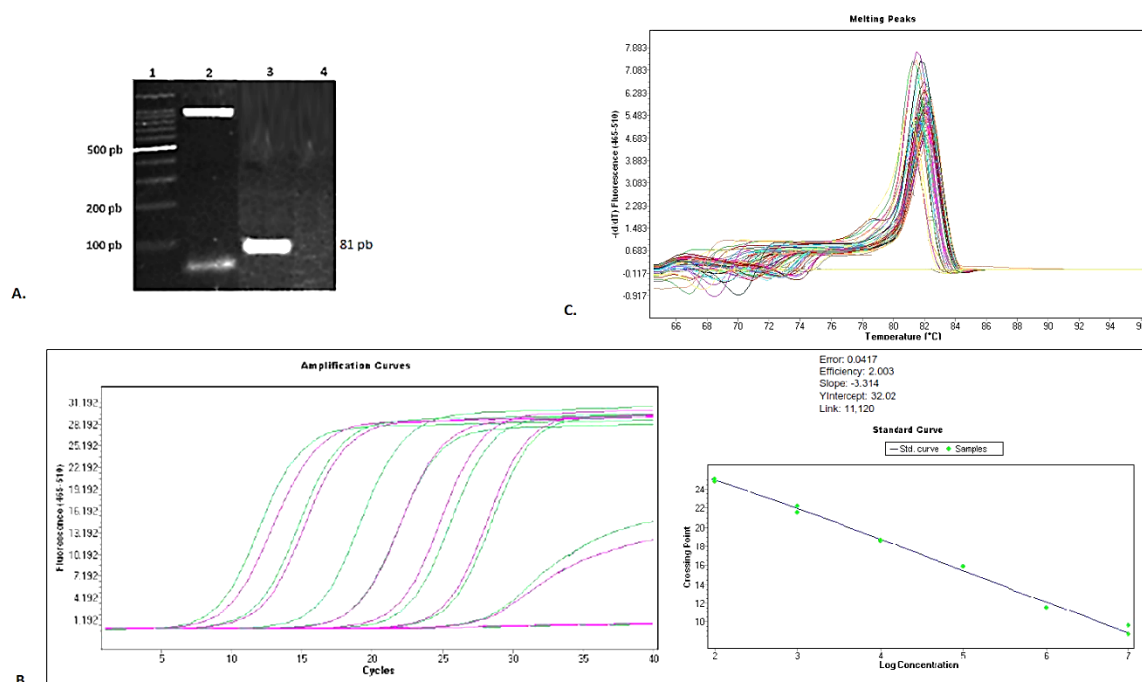


Figura 17. Estandarización de los análisis de expresión relativa de NKX3.1 en las muestras FFPE. A. Amplificación de NKX3.1 en gel de agarosa. 1: Marcador de peso molecular. 2: NKX3.1 en sangre de control. 3: NKX3.1 en tejido FFPE no tumoral adyacente de próstata. Blanco. **B.** Curva estándar. Curva estándar de seis puntos, entre 1×10^7 a 1×10^2 de número de copias/ μ L, con una eficiencia de 2,003 con CPs entre 9,15 y 25,01. **C.** Curvas de fusión de muestras FFPE y estándares.

Los valores de expresión de NKX3.1 presentaron un rango entre 0,00 y 256,50 con una mediana de 0,67. Las frecuencias de expresión de los 83 focos tumorales fueron: 39 con baja expresión (47%), 38 con alta expresión (46%) y 6 con expresión normal (7%).

- **Análisis de expresión relativa de SPINK-1**

El ensayo de RT-PCR se hizo partiendo de una temperatura de anillamiento de 55°C y una concentración de iniciadores de 200nM, usando una muestra de tejido de CaP con GL4 de FFPE y una de sangre, encontrándose que se detectaba la banda esperada con ambos tipos de muestra (Figura 18A), por lo que para manejar el mismo control que en los diferentes ensayos, se usó la muestra FFPE. Se muestran la curva estándar de SPINK-1 (Figura 18B) y las curvas de fusión obtenidas de las muestras comparadas con los estándares (Figura 18C).

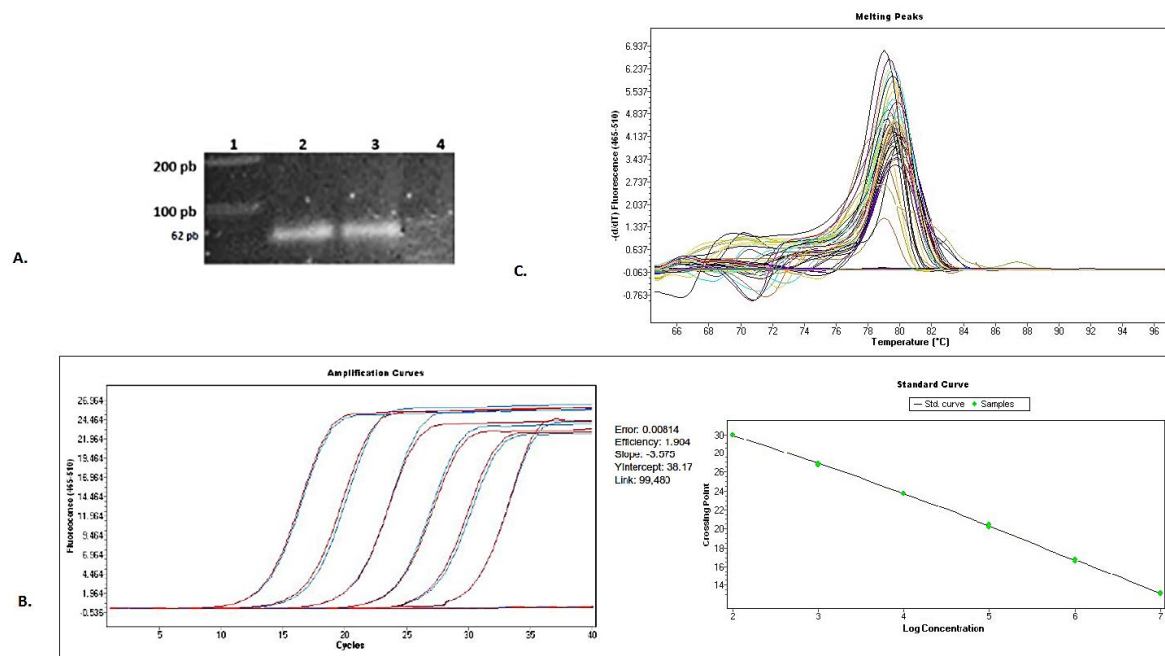


Figura 18. Estandarización de los análisis de expresión relativa de SPINK-1 en las muestras FFPE. A. Amplificación de SPINK-1 en gel de agarosa. . 1: Marcador de peso molecular. 2: SPINK-1 en sangre de control. 3: SPINK-1 en tejido de cáncer de próstata con GL4. Blanco. **B.** Curva estándar. Curva estándar de seis puntos, entre 1×10^7 a 1×10^2 de número de copias/ μ L, con una eficiencia de 1,904 con CPs entre 13,16 y 29,95. **C.** Curvas de fusión de muestras FFPE y estándares.

Los valores de expresión de SPINK-1 presentaron un rango entre 0,00 y 680,92 con una mediana de 0,67. Las frecuencias de expresión de SPINK-1 de los 83 focos tumorales fueron: 42 con baja expresión (51%), 34 con alta expresión (41%) y 7 con expresión normal (8%), siendo predominante la baja expresión de SPINK-1.

5.2 Segundo objetivo

Analizar el grado de concordancia de las alteraciones moleculares entre los focos que permita establecer el origen clonal, como se describió en la metodología.

En la tabla 3 se resumen los resultados de la evaluación del gen de fusión TMPRSS2-ERG y la expresión relativa de ERG, EZH2, SPINK-1 y NKX3.1 por foco neoplásico (83 focos) discriminado por paciente, a partir de los cuales se hizo el análisis de concordancia completa, parcial y discordancia molecular entre los focos de cada paciente.

5.2.1 Determinación de la concordancia con respecto a cada alteración molecular evaluada para todos los pacientes

- **Concordancia respecto al estado de fusión TMPRSS2-ERG**

En ocho de los veinte pacientes analizados (40%), se encontró concordancia molecular. Para un paciente (el número 18) la concordancia fue con respecto a la presencia de la fusión en todos sus focos evaluados, mientras que hubo coincidencia respecto a la ausencia de la fusión en todos los focos neoplásicos de los otros 7 pacientes (número 7, 8, 11, 12, 13, 14 y 19).

Cinco pacientes muestran concordancia parcial asociada al grado de evolución de la lesión neoplásica (25%), encontrándose que los pacientes 1 y 3 presentan la fusión en todos sus focos neoplásicos y solo el foco pre-neoplásico no la presenta; en el paciente 2, HGPIN y GL3, no presentan la fusión, pero ésta aparece en GL4 y ganglio; mientras que para los pacientes 9 y 15 la fusión solo se presenta en ganglios. Finalmente, siete pacientes (número 4, 5, 6, 10, 16, 17 y 20) presentaron discordancia (35%), independiente del grado de lesión.

Tabla 3. Presencia de la fusión TMPRSS2-ERG y expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1, y SPINK-1 por foco en los diferentes pacientes analizados, junto con los grados de concordancia entre los focos de cada paciente.

P	Dx	Fusión TMPRSS2-ERG	Expresión relativa				Concordancia molecular
			ERG	EZH2	NKX3.1	SPINK-1	
1	HGPIN	Negativo	6,37	1,09	0,61	0,26	D
	GL3	Positivo	43,55	0,44	0,30	1,35	
	GL4	Positivo	37,50	2,08	0,74	0,73	
2	HGPIN	Negativo	0,62	0,31	4,11	0,31	D
	GL3	Negativo	0,20	0,08	0,31	0,08	
	GL4	Positivo	3,43	0,30	2,11	0,48	
	Ganglio	Positivo	1,27	0,06	0,30	0,21	
3	HGPIN	Negativo	9,47	0,10	0,17	0,10	PC
	GL3	Positivo	14,56	0,02	0,15	0,02	
	GL4	Positivo	1,34	0,04	0,07	0,01	
	GL5	Positivo	675,40	5,47	0,43	1,08	
4	HGPIN	Negativo	0,37	0,57	1,38	0,97	D
	GL3	Positivo	13,55	1,05	0,54	2,02	
	GL4	Positivo	11,69	0,62	5,17	1,74	
	GL5	Positivo	111,74	1,44	1,18	2,10	
	Ganglio	Negativo	8,91	0,12	0,07	2,74	
5	HGPIN	Positivo	2,16	0,81	0,22	0,64	D
	GL3	Positivo	5,78	0,50	0,28	0,50	
	GL4	Positivo	5,64	0,97	0,49	0,59	
	Ganglio	Negativo	1,48	0,61	0,35	7,93	
	6	HGPIN	Positivo	25,67	0,25	2,45	
GL3		Positivo	8,57	2,91	1,29	2,86	
GL4		Positivo	25,13	0,27	2,28	6,34	
GL4		Negativo	0,64	0,07	2,74	0,71	
7	HGPIN	Negativo	0,84	48,16	0,99	55,39	PC
	GL3	Negativo	0,01	3,15	11,73	0,05	
	GL3	Negativo	0,04	2,65	2,38	0,07	
	GL4	Negativo	0,14	13,43	3,84	0,58	
8	HGPIN	Negativo	0,03	3,46	21,55	0,18	C
	GL3	Negativo	0,02	6,15	13,23	0,07	
	GL3	Negativo	0,01	2,57	6,76	0,02	
	GL4	Negativo	0,01	2,49	5,57	0,03	
9	HGPIN	Negativo	6,60	1,22	0,67	1,02	D
	GL3	Negativo	13,38	0,01	1,16	2,22	
	GL4	Negativo	6,16	1,91	1,73	1,13	
	Ganglio	Positivo	12,95	2,13	0,16	1,06	
10	HGPIN	Negativo	0,56	3,43	0,00	0,47	D
	GL3	Positivo	15,41	8,25	1,84	1,89	
	GL4	Positivo	1,01	11,00	1,42	0,47	
	Ganglio	Negativo	1,40	3,25	0,20	4,32	
11	HGPIN	Negativo	1,44	0,38	0,08	0,42	D
	GL3	Negativo	213,70	64,89	100,90	24,48	
	GL4	Negativo	16,63	12,33	11,96	58,20	
	Ganglio	Negativo	134,16	26,75	0,01	0,17	
	12	HGPIN	Negativo	1,98	2,07	0,61	
GL3		Negativo	0,00	0,06	0,29	0,04	
GL4		Negativo	2,26	8,40	0,70	0,02	
GL5		Negativo	0,27	0,70	0,35	0,00	
Ganglio		Negativo	1,16	2,24	0,01	0,18	
13	GL3	Negativo	7,50	3,95	7,38	0,01	PC
	GL4	Negativo	13,06	3,23	7,05	0,01	
	GL5	Negativo	3,16	7,18	2,30	1,52	
	Ganglio	Negativo	124,77	40,68	0,04	5,67	
	14	HGPIN	Negativo	0,13	0,23	3,39	
GL3		Negativo	0,03	0,19	1,90	0,52	
GL4		Negativo	0,24	0,20	2,24	0,40	
Ganglio		Negativo	3,33	1,74	0,00	0,43	
15		HGPIN	Negativo	0,38	0,11	1,14	0,48
	GL3	Negativo	0,21	0,24	0,52	0,12	
	GL4	Negativo	0,91	2,71	2,33	0,65	
	Ganglio	Positivo	1,43	5,90	0,74	1,55	
16	HGPIN	Positivo	1,99	3,54	1,60	0,12	D
	GL3	Negativo	0,84	3,34	0,11	1,60	
	GL4	Negativo	0,36	2,23	0,69	1,67	
	Ganglio	Positivo	1,30	0,91	0,11	1,93	
17	HGPIN	Positivo	4,75	1,78	1,24	1,19	D
	GL3	Positivo	3,88	0,92	1,27	13,57	
	GL4	Negativo	2,36	0,12	0,89	12,70	
	Ganglio	Negativo	1,27	1,97	0,85	1,17	
18	GL3	Positivo	719,75	131,64	124,80	189,66	C
	GL3	Positivo	433,54	158,51	256,50	680,92	
	GL4	Positivo	17,54	1,70	2,72	9,19	
19	HGPIN	Negativo	0,35	191,10	0,40	3,40	D
	GL3	Negativo	0,04	74,14	1,08	2,31	
	GL3	Negativo	0,68	37,90	2,73	0,51	
	GL4	Negativo	0,29	40,07	2,21	0,07	
	GL4	Negativo	0,26	27,84	2,70	0,02	
20	GL4	Negativo	0,70	0,17	0,65	12,78	D
	GL4	Negativo	0,45	0,21	0,84	52,39	
	GL5	Negativo	0,63	0,09	0,15	11,39	
	GL5	Positivo	1,40	0,08	0,18	14,64	
	GL5	Negativo	0,26	0,26	0,48	39,82	
	Ganglio	Negativo	1,22	0,04	0,00	1,34	
Medianas totales			5,71	0,59	0,67	0,67	

Todos los valores de expresión son relativos al tejido control. Los valores comprendidos entre 0,80-1,20 son tomados como expresión normal (blanco), los menores a 0,80 como bajamente expresados (azul) y por encima de 1,20 altamente expresados (rosado). La concordancia en las alteraciones moleculares entre focos: D: Discordantes (Piel). C: Concordantes (Naranja oscuro). PC: parcialmente concordantes (Naranja claro). P: Paciente. Dx: Diagnóstico histopatológico.

- **Concordancia respecto a la expresión de ERG**

En la tabla 3 podemos encontrar que en once de los veinte pacientes (55%) se encontró concordancia completa en todos sus focos analizados. En ocho pacientes se encontró concordancia molecular respecto a la alta expresión (los números 1, 3, 5, 9, 11, 13, 17 y 18), mientras que para tres (número 7, 8 y 19) respecto a su baja expresión. Para dos pacientes (número 14 y 15) hay concordancia parcial (10%), ya que tan solo el ganglio presenta sobreexpresión de ERG, lo cual podría estar ligado a la progresión tumoral y no asociado a un origen multiclonal. Finalmente, siete de veinte pacientes (número 2, 4, 5, 6, 10, 12, 16, 17 y 20) presentaron discordancia (35%), independiente del grado de lesión.

- **Concordancia respecto a la expresión de EZH2**

En ocho de los veinte pacientes (40%) se encontró concordancia completa de la siguiente forma: concordancia respecto a la alta expresión para 6 pacientes (número 7, 8, 10, 13, 18 y 19), mientras que para 2 (número 2 y 20) respecto a su baja expresión (Tabla 3).

Para 5 pacientes (25%) hay concordancia parcial, lo cual podría estar ligado a la progresión tumoral y no asociado a un origen multiclonal. Las concordancias parciales se presentan de la siguiente forma:

- ✓ Partiendo de una baja expresión y aumentando con la progresión de la enfermedad como se ha reportado en la literatura, en el paciente número 3 hay concordancia molecular respecto a su baja expresión desde HGPIN hasta GL4, pero altamente expresado en GL5; en el paciente número 11 esta bajamente expresado en HGPIN mientras que los demás focos presentan alta expresión; en el paciente número 14 hay concordancia molecular respecto a su baja expresión desde HGPIN hasta GL4 siendo altamente expresado solo en ganglios; en el paciente número 15 hay concordancia molecular respecto a su baja expresión en HGPIN y GL3, siendo altamente expresado en GL4 y ganglios.
- ✓ Por otro lado, está el paciente número 16 quien presenta concordancia molecular respecto a su alta expresión desde HGPIN hasta GL4, con baja expresión baja en ganglios.

Finalmente, siete pacientes (número 1, 4, 5, 6, 9, 12 y 17) presentaron discordancia (35%), independiente del grado de lesión.

- **Concordancia respecto a la expresión de NKX3.1**

En la tabla 3 podemos encontrar que en 8 de los 20 pacientes hay concordancia molecular completa (40%), siendo concordante su baja expresión en cinco pacientes (número 1, 3, 5, 12, y 20), mientras que respecto a su alta expresión en tres pacientes (número 6, 8, y 18).

Para 5 pacientes (25%) hay concordancia parcial de la siguiente forma:

- ✓ En cuatro pacientes se encontró un patrón en el que se parte de una alta expresión y disminuye con la progresión de la enfermedad como se ha reportado en la literatura.
 - Para los pacientes número 13 y 14, la discordancia se dio en ganglio donde se presentó baja expresión, mientras que en las lesiones menos avanzadas la alta expresión es concordante.
 - Para el paciente número 16 solo se observa una alta expresión en HGPIN mientras que en las lesiones avanzadas se ve una baja expresión concordante.
 - Para el paciente número 17, HGPIN y GL3 tienen una alta expresión, mientras que en GL4 y ganglio, hay una baja expresión.
- ✓ Por otro lado, en el paciente número 7 hay expresión normal en HGPIN, pero con una concordancia de alta expresión desde GL3 hasta GL4.

Finalmente, siete pacientes (número 2, 4, 9, 10, 11, 15 y 19) presentaron discordancia (35%), independiente del grado de lesión.

- **Concordancia respecto a la expresión de SPINK-1**

La concordancia completa entre los diferentes focos se dio en seis de los veinte pacientes (30%), cuatro pacientes con baja expresión (número 2, 8, 12 y 14), y dos pacientes con alta expresión (número 18 y 20).

Siete pacientes (35%) presentaron concordancia parcial. La concordancia parcial se presenta de la siguiente forma:

- ✓ Entre los casos en que se dio un incremento en la expresión de SPINK-1 relacionado con el avance de la enfermedad se encuentran:
 - En el paciente número 3 se presentó concordancia respecto a la baja expresión de HGPIN hasta GL4 con un cambio a expresión normal en GL5.
 - En el paciente número 4 se presentó una expresión normal en HGPIN con un cambio hacia la alta expresión concordante de GL3 a ganglio.
 - Los pacientes número 5 y 15, presentaron concordancia respecto a la baja expresión de HGPIN hasta GL4 con un cambio a alta expresión en ganglios.
 - En el paciente número 13, tanto GL3 como GL4 presentan baja expresión, mientras que en GL5 y ganglios hay un cambio hacia una alta de expresión.
 - En el paciente número 16 se presentó una baja expresión en HGPIN con un cambio hacia la alta expresión concordante de GL3 a ganglio.
- ✓ Por otro lado, el paciente número 7 presentó una alta expresión en HGPIN con un cambio hacia la baja expresión concordante de GL3 a GL4.

Finalmente, siete pacientes (número 1, 6, 9, 10, 11, 17 y 19) presentaron discordancia (35%), independiente del grado de lesión.

5.2.2 Determinación de la concordancia con respecto a todas las alteraciones moleculares evaluadas para todos los pacientes

Se evaluó la concordancia por paciente teniendo en cuenta simultáneamente las 5 alteraciones moleculares estudiadas, encontrándose que dos pacientes (10%), el número 8 y 18, son concordantes (Tabla 3). Por otro lado, cuatro de los pacientes (número 3, 7, 13 y 14) fueron parcialmente concordantes (20%), lo que podría estar mostrando un patrón de progresión y no un origen multiclonal. A continuación, se detallan los patrones de concordancia parcial:

- ✓ Tres pacientes mostraron un avance de las alteraciones en concordancia con un avance de la enfermedad, siguiendo un patrón esperado según la literatura (aparición tardía de la fusión; aumento de la expresión de ERG, EZH2 y SPINK-1, en las lesiones más avanzadas, y disminución de la expresión de NKX3.1 en las lesiones más avanzadas).
 - En el caso del paciente número 3 en HGPIN no aparece la fusión, pero en los focos más avanzados sí, mientras que EZH2 y SPINK-1 están bajamente expresado hasta GL4, pero en el foco más avanzado, GL5, aumentan su expresión, mientras que ERG y NKX3.1 son concordantes en todos sus focos.
 - En el paciente 13 hay una alta expresión de NKX3.1 desde GL3 hasta GL5, presentándose una baja expresión tan solo en la etapa más avanzada, en el ganglio, mientras que SPINK-1 aumenta su expresión de forma concordante desde GL5 hasta el ganglio, presentándose concordancia en todas las etapas de progresión para la presencia de la fusión, la expresión de ERG y EZH2.
 - Para el paciente número 14, ERG y EZH2 están bajamente expresados desde HGPIN hasta GL4 mientras que aumentan su expresión en ganglio, mientras que NKX3.1 esta aumentado desde HGPIN hasta GL4, disminuyendo su expresión en ganglio, mientras que el estado de fusión y la expresión de SPINK-1 son concordantes en todos sus focos.

- ✓ Por otro lado, uno de los pacientes (número 7) que mostro concordancia parcial no siguió el modelo de progresión esperado, puesto que en HGPIN se puede observar que tanto NKX3.1 como SPINK-1 parten de una expresión que cambia de forma concordante en los focos más avanzados, sin embargo, NKX3.1 parte de una expresión normal y aumenta con el avance de la enfermedad, mientras que SPINK-1 parte de una alta expresión disminuyendo con el avance de la enfermedad, mientras que el estado de la fusión, la expresión de ERG y de EZH2 son concordantes en todos los focos.

Finalmente, catorce pacientes (número 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19 y 20) presentaron discordancia (70%), independiente del grado de lesión.

- **Multiclonalidad en CaP primario vs monoclonalidad en CaP metastásico**

Se resalta el resultado encontrado en el paciente número 2, puesto que pese a la discordancia molecular, es el único claro ejemplo de que un solo clon podría ser responsable para la dispersión de todos los focos metastásicos, como se ha descrito en la literatura, puesto que en GL4 aparece la fusión que también se encuentra presente en el ganglio, EZH2 y SPINK-1 están bajamente expresados en ambos casos y NKX3.1 pierde su expresión en ganglio como un evento subclonal, como se espera en las lesiones más avanzadas, sin embargo, en el CaP primario se podría presentar un origen multiclonal, si se observa por ejemplo, la expresión de NKX3.1 entre GL3 y GL4 (Tabla 3).

5.3 Tercer objetivo

Determinar si dichas alteraciones podrían definir diferentes subtipos moleculares del CaP.

5.3.1 Determinación de subtipos moleculares por foco

- ✓ ETS(+): De los 83 focos tumorales, 28 tienen la fusión TMPRSS2-ERG evaluada (34%), de los cuales 27 presentan alta expresión y uno expresión normal de ERG, mientras otros 22 focos (26%) tienen ERG altamente expresado sin presencia de la fusión evaluada pero se toman como ETS(+) ya que según la literatura la alta expresión de ERG podría ser debido a la presencia de otras variantes de la fusión no evaluadas en este trabajo. Tomando los 28 focos que presentan la fusión y los 22 que no, pero que presentan alta expresión de ERG, se determinó que 50 de los focos son ETS(+) (60%), por tanto 33 focos cumplen con el criterio de ETS(-) (40%).
- ✓ Sobreexpresión de EZH2: De los 83 focos tumorales 45 tuvieron alta expresión de EZH2 (54%). La sobreexpresión de EZH2 se presenta más en los casos ETS(+) con 29 focos (64%) vs 16 focos que fueron ETS(-) (36%).
- ✓ Baja expresión de NKX3.1: De los 83 focos tumorales 39 tuvieron baja expresión (47%). La baja expresión de NKX3.1 se presenta más en los casos ETS(+) con 22 focos (56%) vs 17 focos (44%) que fueron ETS(-).

Cabe resaltar que independiente del subtipo, hubo seis patrones moleculares particulares asociados a la expresión de EZH2 y de NKX3.1, del menos al más frecuente, como se puede observar en el siguiente diagrama (discriminados por la presencia/ausencia del subtipo ETS):

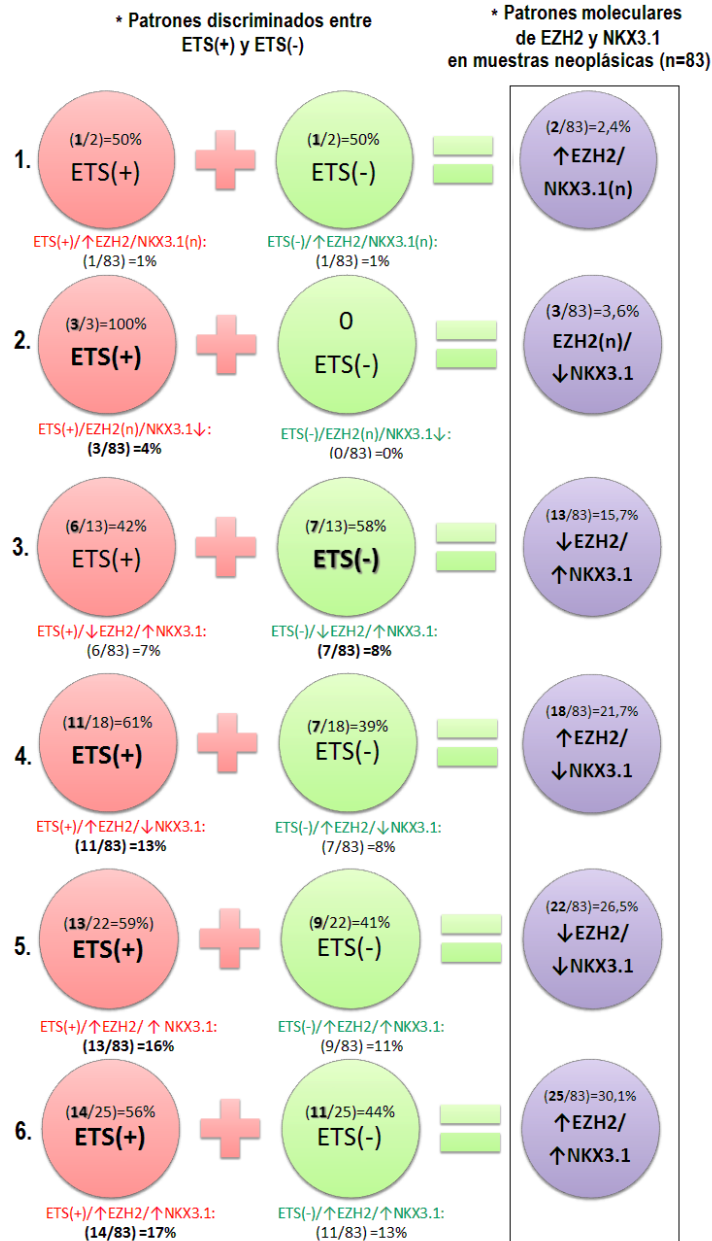


Figura 19. Patrones moleculares asociados a la expresión de EZH2 y NKX3.1 en los 83 focos neoplásicos. A la izquierda los círculos verdes y rojos, muestran la proporción de cada patrón que corresponde a ETS(+) y a ETS(-), indicando en negrita el predominante. Debajo de los círculos rojos y verdes, se muestra la proporción de cada patrón respecto al total de las 83 muestras neoplásicas, discriminado por ETS(+) y ETS(-). (n): Expresión normal. ↑: Alta expresión. ↓: Baja expresión.

- SPINK-1: De los 83 focos tumorales, 34 focos presentaron alta expresión de SPINK-1 (41%). De estos 34 focos, 9 (26%) fueron ETS(-) y 25 (74%) fueron ETS(+), por lo que no se encontró que la alta expresión de SPINK-1 fuera excluyente con la presencia del subtipo ETS(+), aunque la prevalencia de los casos asociados con ETS(-) concuerda con la esperada (11%).

5.3.2 Determinación de subtipos moleculares por paciente

Después de analizar todas las alteraciones moleculares evaluadas en este estudio, se buscó hacer una clasificación de los 20 pacientes de la forma en que se ha intentado hacer en otros estudios, por lo que HGPIN y ganglios no se tuvieron en cuenta en este análisis. Inicialmente 14 pacientes (70%) fueron clasificados como ETS(+), para lo cual el primer criterio fue la presencia de la fusión en al menos uno de sus focos neoplásicos y alta expresión de ERG, por el cual diez pacientes (50%), los número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 17, 18 y 20, fueron considerados ETS(+). Por otro lado, cuatro pacientes (20%), los número 9, 11, 12 y 13, fueron considerados ETS(+) debido a la alta expresión de ERG en al menos uno de sus focos neoplásicos. Por último 6 pacientes (30%), los número 7, 8, 14, 15, 16 y 19 fueron considerados ETS(-) debido a la ausencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG y la baja expresión de ERG. Respecto al resto de alteraciones aquí evaluadas, no se encontraron patrones definidos que logran clasificar a los pacientes en un subtipo más específico debido a la discordancia molecular que se asocia con la heterogeneidad del CaP, lo que en la práctica hace difícil la tarea de clasificar a un paciente correctamente. Respecto a los dos pacientes que presentan concordancia en todos sus focos solo se pudo identificar que uno es ETS(+) (paciente número 18) y el otro ETS(-) (paciente número 8), presentándose sobreexpresión de EZH2 y NKX3.1 para ambos casos, infiriéndose que estos casos pueden estar definidos por otros subtipos, por ejemplo, los determinados por mutaciones. GL4.

5.4 Cuarto objetivo

Analizar si existe asociación entre la presencia o ausencia de las alteraciones moleculares estudiadas y el grado de diferenciación del foco.

5.4.1 Determinación de la relación entre las alteraciones moleculares con el diagnóstico histopatológico

Finalmente, se analizó la presencia de las alteraciones moleculares agrupando los focos de acuerdo con el diagnóstico histopatológico (HGPIIN, GL3, GL4, GL5 y Ganglios) (Figura 20 y Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de los resultados de las alteraciones moleculares estudiadas discriminadas por grados de lesión.

Alteración	HGPIIN (n=17)	GL3 (n=23)	GL4 (n=23)	GL5 (n=7)	Ganglios (n=13)	Valor de p
ETS(+) (Fusión y sobreexpresión de ERG)	53%	52%	57%	57%	100%	0,0439
Alta expresión de EZH2	47%	57%	57%	43%	62%	0,8952
Baja expresión de NKX3.1	53%	35%	35%	71%	100%	0,0010
Alta expresión de SPINK-1	18%	48%	35%	71%	54%	0,0841

Las categorías están representadas por las alteraciones esperadas de acuerdo a la literatura de los biomarcadores analizados. Valor de p obtenido al hacer un análisis por chi-cuadrado (color verde: diferencia significativa).

- **Análisis de relación de la expresión de ERG y la fusión TMPRSS2-ERG con el diagnóstico histopatológico**

El análisis de la distribución de la expresión relativa de ERG presentado en la Figura 20A y E, demuestra que en todos los grupos se presentó una mayor expresión al comparar las medianas de los grupos vs el control, pero no existen diferencias significativas. Al analizar la variable de expresión de ERG de manera categórica como se puede observar en la tabla 4, se puede resaltar que en todos los grados de lesión neoplásica lo más común fue encontrar una expresión de ERG mayor que en el control, siendo mayor el porcentaje de focos con sobreexpresión en los ganglios (100%), presentándose una relación entre la evolución de aparición del subtipo ETS(+) y el grado de displasia de forma estadísticamente significativa ($p=0,0439$).

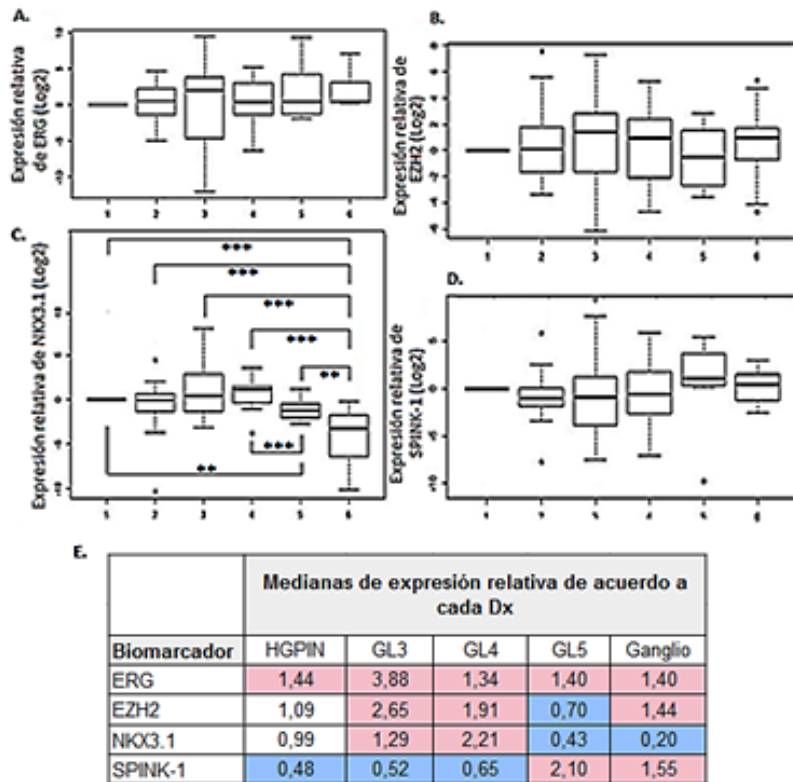


Figura 20. Comparación de la expresión relativa de ERG, EZH2, NKX3.1 y SPINK-1 con los diferentes grados de lesión de CaP presentes en el estudio. A. ERG. B. EZH2 C. NKX3.1. D. SPINK-1. 1: Control. 2: HGPIN. 3:GL3. 4:GL4. 5: GL5. 6: Ganglios. Los puntos son datos atípicos y las llaves con asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$ y $p < 0,001^{***}$) entre los grupos, comparados con el estadístico de prueba U de Mann-Whitney (primero se usó la prueba Kruskal-Wallis por la que se determinó que solo había diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de NKX3.1 respecto a cada Dx). Un asterisco Los datos se graficaron con escala logarítmica (Log_2). Los valores comprendidos entre 0,80-1,20 son tomados como expresión normal (blanco), los menores a 0,80 como bajamente expresados (azul) y por encima de 1,20 altamente expresados (rosado).

- **Análisis de relación de la expresión de EZH2 con el diagnóstico histopatológico**

El análisis de la distribución de expresión de EZH2 en los grupos de diagnóstico histopatológico no muestra diferencias estadísticamente significativas (Figura 20B y E). El análisis de la expresión de EZH2 como variable categórica observado en la tabla 4 tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,8952$).

- **Análisis de relación de la expresión de NKX3.1 con el diagnóstico histopatológico**

El análisis de la distribución de expresión de NKX3.1 mostró que hay una mediana de expresión normal en HGPIN, aumenta en GL3 y GL4, y finalmente disminuye en las lesiones más avanzadas, GL5 y ganglio (Figura 20C y E). En ganglios la expresión fue significativamente baja con respecto a todos los otros grupos, de igual forma al comparar la expresión de GL5 vs el control, GL4 y ganglios, es decir que hay una asociación inversamente proporcional entre la progresión del CaP y los niveles de expresión de NKX3.1. Al analizar la variable de expresión de NKX3.1 de manera categórica como se puede observar en la tabla 4, se puede resaltar que mientras que en GL3 y GL4 el patrón predominante fue su alta expresión, en GL5 y ganglio, el patrón predominante fue su baja expresión, es decir, que los casos con baja expresión, la cual ha sido asociada a un peor pronóstico en otros estudios, se presenta en las lesiones más avanzadas ($p=0,0010$).

- **Análisis de relación de la expresión de SPINK-1 con el diagnóstico histopatológico**

El análisis de la distribución de expresión de SPINK-1 en los grupos de diagnóstico histopatológico muestra que de HGPIN a GL4 la mediana de expresión predominante fue baja, mientras que, en las lesiones más avanzadas, GL5 y ganglio, la mediana de expresión aumentó, en especial en GL5, como se espera a nivel que avance la enfermedad, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 20D y E). El análisis de la expresión de SPINK-1 como variable categórica observado en la tabla 4 muestra un patrón similar al de las medianas, con una mayor presencia de casos de sobreexpresión de SPINK-1 en GL5, pero tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados ($p=0,0841$).

6. Discusión

El cáncer de próstata (CaP) es un cáncer muy común en nuestro país (IARC 2018), caracterizado biológicamente por su heterogeneidad histológica y molecular, no solo entre individuos, sino también al nivel de los múltiples focos originados en la glándula prostática de un solo individuo (Epstein et al. 2005, Wei et al. 2017). La presencia de múltiples focos en el CaP del mismo individuo hace posible la existencia de múltiples clones con diferentes alteraciones moleculares, que pueden estar asociadas con diferentes comportamientos biológicos y que hacen difícil predecir el comportamiento clínico del CaP, lo que la ha hecho muy difícil hacer una distinción entre los casos indolentes y aquellos con mal pronóstico.

Actualmente, la heterogeneidad morfológica en CaP se evalúa con el puntaje de Gleason, que está fuertemente relacionado con el pronóstico de la enfermedad (Epstein et al. 2005), sin embargo, esto es insuficiente, y debido a la falta de biomarcadores para la clasificación se han realizado esfuerzos para establecer algunos subtipos moleculares, especialmente entre los casos con mal pronóstico, que puedan contribuir al diseño de tratamientos específicos de acuerdo con algunas alteraciones canónicas.

El esfuerzo de la caracterización molecular de CaP ha llevado al estudio de la presencia/ausencia del gen de fusión ETS(+), TMPRSS2-ERG, junto con los niveles de expresión de transcripción de posibles biomarcadores, como los oncogenes SPINK-1 y EZH2, y el supresor de tumores NKX3.1, ya que podrían participar en eventos aparentemente excluyentes en la evolución natural del CaP, lo que apoya la posibilidad de una clasificación molecular para esta enfermedad (Lapointe et al. 2007, Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Tomlins et al. 2015, Börno et al. 2012).

TMPRSS2-ERG es, con mucho, el subtipo más común de fusiones con ETS (aproximadamente el 85% de todas las muestras de ETS(+)), a menudo el único subtipo

examinado, y se puede utilizar para estimar la prevalencia de las fusiones con ETS, sin embargo, la determinación de estas se complica por el método de detección (Fernández-Serra et al. 2013). Aunque FISH es la prueba de oro para la detección de fusiones TMPRSS2-ERG, su uso tiene limitaciones. La RT-PCR ofrece algunas ventajas, como un menor costo y su capacidad para discriminar diferentes variantes del gen de fusión TMPRSS2-ERG que el FISH, aunque solo puede detectar isoformas de fusión específicas con pares conocidos del 5'. Además, los detalles de los reordenamientos genómicos también introducen una heterogeneidad estructural considerable en la región 5', ya que además de la transcripción más común, TMPRSS2 (Exon 1)-ERG (Exon 4), utilizada en este estudio, los exones 1, 2 y 3 de TMPRSS2 se pueden combinar con los exones 2, 3, 4, 5 y 6 del ERG en varios patrones de empalme alternativos que pueden generar al menos 17 transcritos de TMPRSS2-ERG diferentes (Zammarchi, Boutsalis, and Cartegni 2013, Clark et al. 2007).

La RT-PCR es una técnica interesante como un complemento potencial de FISH, pero debido a los problemas planteados para el análisis de ETS(+) sin el uso de FISH, los niveles de expresión de ERG se han utilizado para clasificar los casos de ETS(+), ya que su sobreexpresión caracteriza a todo el conjunto independientemente de la fusión (Tomlins et al. 2015, Cancer Genome Atlas Research Network 2015). El análisis de los casos de ETS(+) en este estudio es similar al encontrado en la literatura, encontrándose en 60% por focos y 70% por paciente, cuando el rango en la literatura está entre 50 y 70% tanto intra como intratumoral (Furusato et al. 2010, Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Barry et al. 2007, Fontugne et al. 2016). En este estudio, el uso de los cebadores del transcrito TMPRSS2 (Exon 1)-ERG (Exon 4) identificó el 56% de los casos que finalmente se clasificaron como ETS(+), encontrando que 27 de los 28 focos que presentan la fusión tienen una alta expresión de ERG (96%), pero otros 22 focos presentaron alta expresión de ERG y se consideraron ETS(+), asociados a otras variantes de la fusión no evaluadas aquí, ya que aunque los cebadores utilizados son los más comunes reportados en la literatura, cabe destacar que este es el primer estudio de este estilo con población colombiana y se desconocía si esta variante también era frecuente en esta población.

El efecto de la fusión es la sobreexpresión del oncogén ERG, que a su vez conduce a un aumento en la expresión de EZH2, que actúa como una enzima de histona metiltransferasa

y es un factor clave en el silenciamiento transcripcional del GST NKX3.1. Se ha demostrado que una alta expresión de EZH2 y una baja expresión de NKX3.1 están relacionadas con la enfermedad agresiva y metastásica (Varambally et al. 2002, Bowen et al. 2000, Song et al. 2009). NKX3.1 se une directamente a las secuencias corriente arriba de TMPRSS2 y en los casos ETS(+), regula negativamente la expresión de ERG (Thangapazham et al. 2014), esto constituye un control de retroalimentación negativo ya que ERG a su vez reprime NKX3.1.

Las relaciones encontradas en la evolución molecular del CaP sobre la fusión TMPRSS2-ERG, la sobreexpresión de ERG, EZH2 y la baja expresión de NKX3.1, pueden enriquecer el subtipo ETS(+), pero estas relaciones no se han estudiado ampliamente. Los resultados encontrados aquí mostraron que, independientemente del subtipo, había seis patrones moleculares particulares asociados con EZH2 y NKX3.1 (Figura 19). Es de destacar los patrones número 3 y 4 (Figura 19), ya que en 21,7% de los focos cuando EZH2 se encontró altamente expresado y NKX3.1 fue bajamente expresado simultáneamente, 61% de este patrón se asoció con ETS(+), mientras que en 15,7% de los focos cuando EZH2 tuvo una baja expresión y NKX3.1 se expresó altamente, 58% fueron ETS(-), lo cual concuerda con el modelo de regulación recíproca entre ERG, EZH2 y NKX3.1 encontrado por Kunderfranco et al., 2012 (Figura 7). El patrón 3 sugiere que otras vías alteradas están dirigiendo la carcinogénesis en estos pacientes, puesto que aparentemente los ETS están en equilibrio y NKX3.1 está cumpliendo su labor supresora en esta vía (Figura 7).

Aunque la mayoría de los estudios ha demostrado que NKX3.1 está regulado a la baja en muchos CaP primarios, en la mayoría de los CaP de alto grado y de los metastásicos se pierde, e incluso se ha informado su eliminación completa (Akamatsu et al. 2010, Lapointe et al. 2007, Bethel et al. 2006) y en este estudio se utilizaron casos de mal pronóstico (casos que presentaban metástasis locales y recidiva bioquímica), y se esperaba que NKX3.1 se presentara bajamente expresado mientras que EZH2 se sobreexpresara, los patrones predominantes fueron el 5 y el 6, en los cuales tanto EZH2 como NKX3.1 tenían una baja expresión o una alta expresión de forma simultánea, respectivamente, y no una relación inversa como se esperaba.

Los patrones 2 y 5 de expresión de EZH2 y NKX3.1 (Figura 19), pueden ser explicados por la pérdida de expresión de NKX3.1 por otros métodos independientes de EZH2. La metilación específica de tumor en dinucleótidos CpG seleccionados combinada con pérdida de heterocigosidad, podrían ser un predictor fuerte de baja expresión de NKX3.1 (Asatiani et al. 2005). Por otro lado, la disminución de la proteína NKX3.1 se ha relacionado con un nivel de mRNA normal o aumentado, lo que sugiere que la regulación post-transcripcional de NKX3.1, como la ubiquitinación, lo cual ocurre en un porcentaje significativo de casos de CaP (Padmanabhan et al. 2016, Bethel et al. 2006), lo cual podría estar explicando lo encontrado en los patrones 1 y 6. La baja expresión de NKX3.1 predispone la reorganización de genes al afectar el ensamblaje del complejo de proteínas reparadoras de ADN en el sitio de ruptura, lo que aumenta la frecuencia de yuxtaposición de TMPRSS2 y ERG inducida por el receptor de andrógenos (Asatiani et al. 2005, Xu et al. 2000), por lo que a pesar de la baja expresión de EZH2 sigue existiendo un alto grado de asociación con los ETS(+).

Aunque EZH2 es un gen objetivo de TMPRSS2-ERG, y de hecho se ha informado que los casos con ETS(+) tienen niveles altos de EZH2 en comparación con la próstata normal, los informes también sugieren que los niveles de mRNA de EZH2 son significativamente más altos en ETS(-), que en ETS(+), que puede deberse a una mayor alteración de los eventos epigenómicos en los casos ETS(-) (Börner et al. 2012) y algunos estudios han detectado que existe un ETS(+) subtipo que también se caracteriza por la sobreexpresión de EZH2 pero independiente de ERG (Melling et al. 2015). De acuerdo con los focos que presentaron sobreexpresión de EZH2, en general, no se encontró mayor asociación entre los niveles más altos de EZH2 con el ETS(-) (Prueba U de Mann-Whitney, $p=0.884$). La sobreexpresión de EZH2 estuvo más presente en el ETS(+) con el 60% de los casos frente al 40% que fue ETS(-).

Ya que ni la expresión de EZH2, NKX3.1 y SPINK-1, se pudo relacionar con los ETS(-), la ausencia del gen de fusión y/o la baja expresión de ERG fueron los criterios que clasificaron estos casos. Se ha demostrado que en cultivos en 3D de la línea celular VCaP con reducción de ERG, se logra una morfología similar a un fenotipo de células epiteliales más organizadas, lo que significa que la reducción de los niveles de expresión de ERG puede favorecer la diferenciación y la derogación. El programa de proliferación celular en respuesta al cáncer, que concuerda con lo que se encontró en los casos ETS(-) de este

estudio, donde el hallazgo predominante fue bajo y ERG no normal (Nagai et al. 2018, Tan et al. 2010).

El gen SPINK-1 se expresa tanto en la enfermedad prostática benigna como en la maligna, y algunos estudios sugieren que el aumento en su expresión se encuentra en los cánceres con mayor puntuación de Gleason, es decir, más agresivo (Paju et al. 2007, Jhavar et al. 2009, Leinonen et al. 2010). El mRNA SPINK1 se encuentra generalmente en los cánceres de ETS(-) en aproximadamente el 10-15% de los casos (Tomlins et al. 2008, Ateeq et al. 2011), sin embargo, su relación con la progresión de CaP no está del todo clara, ya que aunque algunos estudios afirman que esta expresión está vinculada a la recurrencia bioquímica (detectada en los análisis de PSA) (Paju et al. 2007, Jhavar et al. 2009, Leinonen et al. 2010), otros dicen que No hay relación (Flavin et al. 2014). En este estudio, la frecuencia de casos de SPINK-1 sobreexpresados en ETS(-) coincide con lo esperado (11%), pero se debe tener en cuenta que los focos que dieron positivo no mostraron una exclusividad total con el ETS(+). y de hecho, hubo más asociados con estos (74%) que con el ETS(-), tal vez porque la sobreexpresión de SPINK-1 da una mayor robustez al subtipo SPOP mutado pero no es la alteración canónica, aunque hay No hay muchos estudios que los evalúen juntos (Cancer Genome Atlas Research Network 2015).

Aunque está claro que el CaP es una enfermedad multifocal, no está claro si los focos tumorales pueden surgir clones independientes y, de ser así, en qué medida la heterogeneidad molecular y patológica entre estos clones es un factor determinante en la historia natural de la enfermedad. El tumor índice/dominante en tumores multifocales significa un mayor foco tumoral, que puede correlacionarse con los parámetros patológicos que son significativos desde el punto de vista del pronóstico (McNeal, Price, et al. 1988). Esto es cierto en la mayoría de los casos (88.7%), sin embargo, estos parámetros patológicos a veces se encuentran en focos secundarios con un volumen menor en un número significativo de casos (11,3%) (Huang et al. 2014). Debido a la multifocalidad de CaP, establecer estos subtipos no es una tarea fácil, por esta razón en este estudio, los análisis se llevaron a cabo en diferentes focos del mismo paciente.

Aunque el peso de la evidencia puede indicar un origen independiente para los focos tumorales, no se ha descartado por completo la posibilidad de que surjan tumores

separados espacialmente a través de la diseminación intraglandular (Cheng et al. 1998, Liu et al. 2009). Sin embargo, estudios anteriores han sugerido que la evaluación de la aparición de la fusión TMPRSS2-ERG por FISH en el CaP multifocal muestra que entre el 40% y el 50% de los focos son discordantes en cuanto a la presencia o ausencia de la fusión, pero dentro de cualquier foco, el estado de este gen de fusión es homogéneo (Barry et al. 2007).

En este estudio, inicialmente, solo con los resultados del estado de fusión TMPRSS2-ERG se puede definir un desajuste molecular intratumoral que apoya la noción de evolución multiclonal, pero esta discordancia aumenta al observar los otros patrones moleculares y aumenta la heterogeneidad. De los 20 pacientes evaluados, 14 pacientes (70%) mostraron una discordancia molecular en al menos una de las cinco alteraciones evaluadas, asociadas con un origen multiclonal, mientras que los otros 6 pacientes (30%) podrían tener un origen monoclonal, con 4 pacientes con discordancias moleculares asociadas a la evolución de la enfermedad.

Boutros et al. (2015), Cooper et al. (2015) y Wei et al. (2017) (Boutros, Fraser et al. 2015, Cooper, Eeles et al. 2015, Wei, Wang et al. 2017) encontraron resultados similares a este estudio, en términos de la discordancia intratumoral e inter-vitamina multicelular, utilizando el completo secuenciación del genoma. Adicionalmente, Wei et al. (2017) también tuvieron resultados de transcriptoma y utilizaron kits de diagnóstico (Decipher, Prolaris y Oncotype DX), que analizan los niveles de expresión de varios genes, lo que muestra que la correlación de puntuaciones entre diferentes focos de CaP en un individuo es baja y no se correlaciona con la taxonomía molecular propuesta por la TCGA (Cancer Genome Atlas Research Network 2015, Wei et al. 2017). Estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar el papel de la multiclonalidad, que presenta diferentes alteraciones y subtipos en el mismo paciente y complica su aplicación en la oncología traslacional, ya que otras alteraciones distintas del índice pueden ser determinantes de metástasis.

Si bien la próstata en sí puede albergar focos tumorales tanto positivos como negativos para la fusión, solo hay un patrón en los diferentes sitios metastásicos en el mismo paciente (Mehra et al. 2008). El resultado encontrado en el paciente número 2 se destaca, ya que en GL4 aparece la fusión que también está presente en el ganglio, mientras que EZH2 y SPINK-1 se expresan pobremente en ambos casos y NKX3.1 pierde su expresión en el

ganglio como evento subclonal, como esperado en las lesiones más avanzadas, mostrando un patrón en el que un solo clon podría ser responsable de la dispersión de todos los focos metastásicos, sin embargo, en CaP primario podría estar presente un origen multiclonal con respecto a la evolución de la expresión de NKX3.1.

Se espera una menor heterogeneidad intermetastásica por varias razones. Primero, las mutaciones en el gen conductor pueden no conferir la misma ventaja en el microambiente del tumor primario y en un sitio distante, lo que reduce la probabilidad de heterogeneidad. En segundo lugar, el crecimiento del tumor primario puede disminuir debido a restricciones de espacio o nutrientes o escisión quirúrgica, lo que también reduce la heterogeneidad intermetastásica esperada. En tercer lugar, las células cancerosas avanzadas ya han adquirido múltiples mutaciones portadoras de genes en varias vías, posiblemente reduciendo el número de mutaciones adicionales disponibles de este gen que pueden conferir una ventaja selectiva sustancial (Reiter et al. 2018).

Cabe señalar que en muchos casos estudiados aquí, las alteraciones encontradas en los ganglios linfáticos y GL5, son las que mejor se adaptan al comportamiento esperado y están lejos de la evolución con cánceres menos avanzados, lo que concuerda con la observación en otros estudios y esto puede dar una visión general de la heterogeneidad molecular de los focos, ya que puede ocurrir que existan focos no analizados que quizás lleven una evolución molecular como la observada en los ganglios, y no se descarta que otros subtipos propuestos por diferentes estudios que no se han evaluado en este estudio puedan clasificar a estos pacientes.

Cuando se realizó el análisis por grado de lesión de todas las alteraciones evaluadas aquí, se encontró que todas se pueden encontrar a partir de la lesión pre-neoplásica, por lo que en términos generales se observó que todas las alteraciones evaluadas aquí son eventos clonales tempranos en el estudio de la evolución natural del CaP, aunque se encontró que la alta expresión de ERG y EZH2, junto con la baja expresión de NKX3.1 tienen un patrón de evolución similar a HGPIN, mientras que el patrón de evolución de SPINK-1 en HGPIN es diferente. Sin embargo, solo la sobreexpresión de ERG y la baja expresión de NKX3.1 muestran un patrón de desregulación proporcional a la progresión de la enfermedad, que también podría evidenciarse al evaluar las discordancias moleculares encontradas en los

pacientes número 3, 7, 13 y 14, que muestran un patrón de progresión y no una discordancia molecular debido a un origen multiclonal.

Finalmente, hallazgos como estos, que intentan establecer un marco para definir la secuencia de eventos moleculares en la carcinogénesis de esta enfermedad, demuestran que no es una tarea fácil debido a la multiclonalidad, requiriéndose un análisis exhaustivo y multifocal, ya que debido a la alta heterogeneidad tanto inter como intra-paciente, no existe un patrón lineal que defina el curso de la enfermedad, sino que, podemos encontrar diferentes vías de evolución tumoral que actúan juntas y en otros casos, vías excluyentes entre sí, que podrían definir subtipos específicos que definen la respuesta particular de cada paciente contra la enfermedad, pero es necesario evaluar más alteraciones para definir aquellos subtipos.

7. Conclusiones y perspectivas

7.1. Conclusiones

- El material proveniente de muestras de tejido FFPE de prostatectomías radicales de pacientes con CaP fue suficiente y adecuado para la determinación de las alteraciones moleculares analizadas con concentraciones finales de RNA bajas (2 ng/ μ L).
- Los resultados encontrados en éste estudio apoyan la noción de que en su mayoría los CaP multifocales se componen de múltiples clones, sin embargo, este trabajo no descartó la monoclonalidad.
- Debido a la alta multiclonalidad (70%), la evaluación molecular de un solo foco no brinda un panorama completo de la enfermedad en el paciente. Aunque se pueden asignar subtipos moleculares de esta manera, este tipo de análisis dificulta la asociación del subtipo molecular con el pronóstico y elección del tratamiento adecuado.
- Todas las alteraciones estudiadas son de aparición temprana detectándose desde la lesión pre-neoplásica, HGPIN, pero solo la expresión de ERG y NKX3.1 muestran un patrón de progresión.

7.2 Perspectivas

A partir de este estudio, se plantea la realización de un trabajo, en el cual se evalúen éstas y otras alteraciones moleculares (p.ej. mutaciones) en diferentes focos de un grupo de pacientes, para establecer si de esta manera es posible predecir el pronóstico clínico de la enfermedad para cada paciente, de una forma más acertada que con solo el uso del tumor índice.

Bibliografía

(ASCO), American Society of Clinical Oncology. 2018. "Cáncer de próstata Guide.", accessed Diciembre. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pr%C3%B3stata>.

Abate-Shen, C., M. M. Shen, and E. Gelmann. 2008. "Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis." *Differentiation* 76 (6):717-27. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00292.x.

Abouassaly, R., IM. Thompson, EA. Platz, and EA. Klein. 2012. *Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer*. Edited by Kavoussi LR. Wein A. Novick and A. Partin AW. Peters CA. 10 ed.

ACS, American Cancer Society. 2019. "Cáncer de próstata. -Tratamiento del cáncer de próstata. Tratamiento inicial del cáncer de próstata según la etapa. - Factores de riesgo del cáncer de próstata.", accessed Enero. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata>.

Adamo, P., and M. R. Ladomery. 2016. "The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer." *Oncogene* 35 (4):403-14. doi: 10.1038/onc.2015.109.

Akamatsu, S., R. Takata, K. Ashikawa, N. Hosono, N. Kamatani, T. Fujioka, O. Ogawa, M. Kubo, Y. Nakamura, and H. Nakagawa. 2010. "A functional variant in NKX3.1 associated with prostate cancer susceptibility down-regulates NKX3.1 expression." *Hum Mol Genet* 19 (21):4265-72. doi: 10.1093/hmg/ddq350.

Allison, K. H., and G. W. Sledge. 2014. "Heterogeneity and cancer." *Oncology (Williston Park)* 28 (9):772-8.

- Andreoiu, M., and L. Cheng. 2010. "Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications." *Hum Pathol* 41 (6):781-93. doi: 10.1016/j.humpath.2010.02.011.
- Andriole, G. L., E. D. Crawford, R. L. Grubb, S. S. Buys, D. Chia, T. R. Church, M. N. Fouad, C. Isaacs, P. A. Kvale, D. J. Reding, J. L. Weissfeld, L. A. Yokochi, B. O'Brien, L. R. Ragard, J. D. Clapp, J. M. Rathmell, T. L. Riley, A. W. Hsing, G. Izmirlian, P. F. Pinsky, B. S. Kramer, A. B. Miller, J. K. Gohagan, P. C. Prorok, and PLCO Project Team. 2012. "Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up." *J Natl Cancer Inst* 104 (2):125-32. doi: 10.1093/jnci/djr500.
- Asatiani, E., W. X. Huang, A. Wang, E. Rodriguez Ortner, L. R. Cavalli, B. R. Haddad, and E. P. Gelmann. 2005. "Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer." *Cancer Res* 65 (4):1164-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2688.
- Ateeq, Bushra., Bhatia, Vipul. , Sakshi. Goel, Correspondence information about the author Bushra Email the author Bushra AteVipul Bhatia, and Sakshi Goel 2016. "Molecular Discriminators of Racial Disparities in Prostate Cancer." *Trends in Cancer* 2 (3):116-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2016.01.005>.
- Ateeq, B., S. A. Tomlins, B. Laxman, I. A. Asangani, Q. Cao, X. Cao, Y. Li, X. Wang, F. Y. Feng, K. J. Pienta, S. Varambally, and A. M. Chinnaiyan. 2011. "Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer." *Sci Transl Med* 3 (72):72ra17. doi: 10.1126/scitranslmed.3001498.
- Baca, S. C., and L. A. Garraway. 2012. "The genomic landscape of prostate cancer." *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:69. doi: 10.3389/fendo.2012.00069.
- Baca, S. C., D. Prandi, M. S. Lawrence, J. M. Mosquera, A. Romanel, Y. Drier, K. Park, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, M. Ghandi, E. Van Allen, G. V. Kryukov, A. Sboner, J. P. Theurillat, T. D. Soong, E. Nickerson, D. Auclair, A. Tewari, H. Beltran, R. C.

- Onofrio, G. Boysen, C. Guiducci, C. E. Barbieri, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, G. Saksena, D. Voet, A. H. Ramos, W. Winckler, M. Cipicchio, K. Ardlie, P. W. Kantoff, M. F. Berger, S. B. Gabriel, T. R. Golub, M. Meyerson, E. S. Lander, O. Elemento, G. Getz, F. Demichelis, M. A. Rubin, and L. A. Garraway. 2013. "Punctuated evolution of prostate cancer genomes." *Cell* 153 (3):666-77. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.021.
- Barbieri, C. E., S. C. Baca, M. S. Lawrence, F. Demichelis, M. Blattner, J. P. Theurillat, T. A. White, P. Stojanov, E. Van Allen, N. Stransky, E. Nickerson, S. S. Chae, G. Boysen, D. Auclair, R. C. Onofrio, K. Park, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, K. Sheikh, T. Vuong, C. Guiducci, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S. L. Carter, G. Saksena, D. Voet, W. M. Hussain, A. H. Ramos, W. Winckler, M. C. Redman, K. Ardlie, A. K. Tewari, J. M. Mosquera, N. Rupp, P. J. Wild, H. Moch, C. Morrissey, P. S. Nelson, P. W. Kantoff, S. B. Gabriel, T. R. Golub, M. Meyerson, E. S. Lander, G. Getz, M. A. Rubin, and L. A. Garraway. 2012. "Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer." *Nat Genet* 44 (6):685-9. doi: 10.1038/ng.2279.
- Barbieri, C. E., C. H. Bangma, A. Bjartell, J. W. Catto, Z. Culig, H. Grönberg, J. Luo, T. Visakorpi, and M. A. Rubin. 2013. "The mutational landscape of prostate cancer." *Eur Urol* 64 (4):567-76. doi: 10.1016/j.eururo.2013.05.029.
- Barbieri, C. E., F. Demichelis, and M. A. Rubin. 2014. "The lethal clone in prostate cancer: redefining the index." *Eur Urol* 66 (3):395-7. doi: 10.1016/j.eururo.2013.12.052.
- Barry, M., S. Perner, F. Demichelis, and M. A. Rubin. 2007. "TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications." *Urology* 70 (4):630-3. doi: 10.1016/j.urology.2007.08.032.
- Berger, M. F., M. S. Lawrence, F. Demichelis, Y. Drier, K. Cibulskis, A. Y. Sivachenko, A. Sboner, R. Esgueva, D. Pflueger, C. Sougnez, R. Onofrio, S. L. Carter, K. Park, L. Habegger, L. Ambrogio, T. Fennell, M. Parkin, G. Saksena, D. Voet, A. H. Ramos,

- T. J. Pugh, J. Wilkinson, S. Fisher, W. Winckler, S. Mahan, K. Ardlie, J. Baldwin, J. W. Simons, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, P. W. Kantoff, L. Chin, S. B. Gabriel, M. B. Gerstein, T. R. Golub, M. Meyerson, A. Tewari, E. S. Lander, G. Getz, M. A. Rubin, and L. A. Garraway. 2011. "The genomic complexity of primary human prostate cancer." *Nature* 470 (7333):214-20. doi: 10.1038/nature09744.
- Bethel, C. R., D. Faith, X. Li, B. Guan, J. L. Hicks, F. Lan, R. B. Jenkins, C. J. Bieberich, and A. M. De Marzo. 2006. "Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion." *Cancer Res* 66 (22):10683-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0963.
- Blattner, M., D. J. Lee, C. O'Reilly, K. Park, T. Y. MacDonald, F. Khani, K. R. Turner, Y. L. Chiu, P. J. Wild, I. Dolgalev, A. Heguy, A. Sboner, S. Ramazangolu, H. Hieronymus, C. Sawyers, A. K. Tewari, H. Moch, G. S. Yoon, Y. C. Known, O. Andrén, K. Fall, F. Demichelis, J. M. Mosquera, B. D. Robinson, C. E. Barbieri, and M. A. Rubin. 2014. "SPOP mutations in prostate cancer across demographically diverse patient cohorts." *Neoplasia* 16 (1):14-20.
- Bostwick, D. G., A. Shan, J. Qian, M. Darson, N. J. Maihle, R. B. Jenkins, and L. Cheng. 1998. "Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma." *Cancer* 83 (9):1995-2002.
- Boutros, P. C., M. Fraser, N. J. Harding, R. de Borja, D. Trudel, E. Lalonde, A. Meng, P. H. Hennings-Yeomans, A. McPherson, V. Y. Sabelnykova, A. Zia, N. S. Fox, J. Livingstone, Y. J. Shiah, J. Wang, T. A. Beck, C. L. Have, T. Chong, M. Sam, J. Johns, L. Timms, N. Buchner, A. Wong, J. D. Watson, T. T. Simmons, C. P'ng, G. Zafarana, F. Nguyen, X. Luo, K. C. Chu, S. D. Prokopec, J. Sykes, A. Dal Pra, A. Berlin, A. Brown, M. A. Chan-Seng-Yue, F. Yousif, R. E. Denroche, L. C. Chong, G. M. Chen, E. Jung, C. Fung, M. H. Starmans, H. Chen, S. K. Govind, J. Hawley, A. D'Costa, M. Pintilie, D. Waggott, F. Hach, P. Lambin, L. B. Muthuswamy, C. Cooper, R. Eeles, D. Neal, B. Tetu, C. Sahinalp, L. D. Stein, N. Fleshner, S. P. Shah, C. C. Collins, T. J. Hudson, J. D. McPherson, T. van der Kwast, and R. G. Bristow. 2015.

- "Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer." *Nat Genet* 47 (7):736-45. doi: 10.1038/ng.3315.
- Bowen, C., L. Bubendorf, H. J. Voeller, R. Slack, N. Willi, G. Sauter, T. C. Gasser, P. Koivisto, E. E. Lack, J. Kononen, O. P. Kallioniemi, and E. P. Gelmann. 2000. "Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression." *Cancer Res* 60 (21):6111-5.
- Bowen, C., T. Zheng, and E. P. Gelmann. 2015. "NKX3.1 Suppresses TMPRSS2-ERG Gene Rearrangement and Mediates Repair of Androgen Receptor-Induced DNA Damage." *Cancer Res* 75 (13):2686-98. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3387.
- Brenner, J. C., B. Ateeq, Y. Li, A. K. Yocum, Q. Cao, I. A. Asangani, S. Patel, X. Wang, H. Liang, J. Yu, N. Palanisamy, J. Siddiqui, W. Yan, X. Cao, R. Mehra, A. Sabolch, V. Basrur, R. J. Lonigro, J. Yang, S. A. Tomlins, C. A. Maher, K. S. Elenitoba-Johnson, M. Hussain, N. M. Navone, K. J. Pienta, S. Varambally, F. Y. Feng, and A. M. Chinnaiyan. 2011. "Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer." *Cancer Cell* 19 (5):664-78. doi: 10.1016/j.ccr.2011.04.010.
- Börno, S. T., A. Fischer, M. Kerick, M. Fälth, M. Laible, J. C. Brase, R. Kuner, A. Dahl, C. Grimm, B. Sayanjali, M. Isau, C. Röhr, A. Wunderlich, B. Timmermann, R. Claus, C. Plass, M. Graefen, R. Simon, F. Demichelis, M. A. Rubin, G. Sauter, T. Schlomm, H. Sülthmann, H. Lehrach, and M. R. Schweiger. 2012. "Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation." *Cancer Discov* 2 (11):1024-35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0041.
- Cairns, R. A., and T. W. Mak. 2013. "Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities." *Cancer Discov* 3 (7):730-41. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0083.

- Carter, B. S., T. H. Beaty, G. D. Steinberg, B. Childs, and P. C. Walsh. 1992. "Mendelian inheritance of familial prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (8):3367-71. doi: 10.1073/pnas.89.8.3367.
- Cheng, L., S. Y. Song, T. G. Pretlow, F. W. Abdul-Karim, H. J. Kung, D. V. Dawson, W. S. Park, Y. W. Moon, M. L. Tsai, W. M. Linehan, M. R. Emmert-Buck, L. A. Liotta, and Z. Zhuang. 1998. "Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 90 (3):233-7.
- Clark, J., S. Merson, S. Jhavar, P. Flohr, S. Edwards, C. S. Foster, R. Eeles, F. L. Martin, D. H. Phillips, M. Crundwell, T. Christmas, A. Thompson, C. Fisher, G. Kovacs, and C. S. Cooper. 2007. "Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate." *Oncogene* 26 (18):2667-73. doi: 10.1038/sj.onc.1210070.
- COLCIENCIAS, Ministerio de Salud y Protección Social - Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación en Salud., and Instituto Nacional de Cancerología ESE-Sociedad Colombiana de Urología. INC-ESE. 2013. Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación del cáncer de próstata. Sistema General de Seguridad Social en Salud – Colombia Guía completa. En línea: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/ETS/GPC_Comple_Prostata.pdf.
- Cooper, C. S., R. Eeles, D. C. Wedge, P. Van Loo, G. Gudem, L. B. Alexandrov, B. Kremeyer, A. Butler, A. G. Lynch, N. Camacho, C. E. Massie, J. Kay, H. J. Luxton, S. Edwards, Z. Kote-Jarai, N. Dennis, S. Merson, D. Leongamornlert, J. Zamora, C. Corbishley, S. Thomas, S. Nik-Zainal, M. Ramakrishna, S. O'Meara, L. Matthews, J. Clark, R. Hurst, R. Mithen, R. G. Bristow, P. C. Boutros, M. Fraser, S. Cooke, K. Raine, D. Jones, A. Menzies, L. Stebbings, J. Hinton, J. Teague, S. McLaren, L. Mudie, C. Hardy, E. Anderson, O. Joseph, V. Goody, B. Robinson, M. Maddison, S. Gamble, C. Greenman, D. Berney, S. Hazell, N. Livni, C. Fisher, C. Ogden, P. Kumar, A. Thompson, C. Woodhouse, D. Nicol, E. Mayer, T. Dudderidge, N. C. Shah, V. Gnanapragasam, T. Voet, P. Campbell, A. Futreal, D. Easton, A. Y.

- Warren, C. S. Foster, M. R. Stratton, H. C. Whitaker, U. McDermott, D. S. Brewer, D. E. Neal, and ICGC Prostate Group. 2015. "Corrigendum: analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue." *Nat Genet* 47 (6):689. doi: 10.1038/ng0615-689b.
- Crawford, E. D., R. Grubb, A. Black, G. L. Andriole, M. H. Chen, G. Izmirlian, C. D. Berg, and A. V. D'Amico. 2011. "Comorbidity and mortality results from a randomized prostate cancer screening trial." *J Clin Oncol* 29 (4):355-61. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5979.
- DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística. 2005. Colombia y sus grupos étnicos: la visibilidad estadística de los grupos étnicos. En línea: https://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/visibilidad_estadistica_etnicos.pdf.
- De-Torres. 2007. Prognosis and predictive factors of prostate cancer in the prostatic biopsy. *Actas Urol Esp.* .
- Deb, G., V. S. Thakur, and S. Gupta. 2013. "Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: epigenetics and beyond." *Epigenetics* 8 (5):464-76. doi: 10.4161/epi.24532.
- Duan, S., and M. Pagano. 2015. "SPOP Mutations or ERG Rearrangements Result in Enhanced Levels of ERG to Promote Cell Invasion in Prostate Cancer." *Mol Cell* 59 (6):883-4. doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.003.
- Dzamba, M., A. K. Ramani, P. Buczkowicz, Y. Jiang, M. Yu, C. Hawkins, and M. Brudno. 2017. "Identification of complex genomic rearrangements in cancers using CouGaR." *Genome Res* 27 (1):107-117. doi: 10.1101/gr.211201.116.
- el-Shirbiny, A. M. 1994. "Prostatic specific antigen." *Adv Clin Chem* 31:99-133.

- Epstein, J. I., W. C. Allsbrook, M. B. Amin, L. L. Egevad, and ISUP Grading Committee. 2005. "The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *Am J Surg Pathol* 29 (9):1228-42.
- Epstein, J. I., L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley, P. A. Humphrey, and Grading Committee. 2016. "The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System." *Am J Surg Pathol* 40 (2):244-52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
- Esgueva, R., S. Perner, C. J LaFargue, V. Scheble, C. Stephan, M. Lein, F. R. Fritzsche, M. Dietel, G. Kristiansen, and M. A. Rubin. 2010. "Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort." *Mod Pathol* 23 (4):539-46. doi: 10.1038/modpathol.2009.193.
- Feldman, B. J., and D. Feldman. 2001. "The development of androgen-independent prostate cancer." *Nat Rev Cancer* 1 (1):34-45. doi: 10.1038/35094009.
- Fernández-Serra, A., L. Rubio, A. Calatrava, J. Rubio-Briones, R. Salgado, R. Gil-Benso, B. Espinet, Z. García-Casado, and J. A. López-Guerrero. 2013. "Molecular characterization and clinical impact of TMPRSS2-ERG rearrangement on prostate cancer: comparison between FISH and RT-PCR." *Biomed Res Int* 2013:465179. doi: 10.1155/2013/465179.
- Fernández-Serra, A., J. Rubio-Briones, Z. García-Casado, E. Solsona, and J. A. López-Guerrero. 2011. "[Prostate cancer: the revolution of the fusion genes]." *Actas Urol Esp* 35 (7):420-8. doi: 10.1016/j.acuro.2010.11.019.
- Ferraldeschi, R., J. Welti, J. Luo, G. Attard, and J. S. de Bono. 2015. "Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects." *Oncogene* 34 (14):1745-57. doi: 10.1038/onc.2014.115.

Flavin, R., A. Pettersson, W. K. Hendrickson, M. Fiorentino, S. Finn, L. Kunz, G. L. Judson, R. Lis, D. Bailey, C. Fiore, E. Nuttall, N. E. Martin, E. Stack, K. L. Penney, J. R. Rider, J. Sinnott, C. Sweeney, H. D. Sesso, K. Fall, E. Giovannucci, P. Kantoff, M. Stampfer, M. Loda, and L. A. Mucci. 2014. "SPINK1 protein expression and prostate cancer progression." *Clin Cancer Res* 20 (18):4904-11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1341.

Fontugne, J., K. Davis, N. Palanisamy, A. Udager, R. Mehra, A. S. McDaniel, J. Siddiqui, M. A. Rubin, J. M. Mosquera, and S. A. Tomlins. 2016. "Clonal evaluation of prostate cancer foci in biopsies with discontinuous tumor involvement by dual ERG/SPINK1 immunohistochemistry." *Mod Pathol* 29 (2):157-65. doi: 10.1038/modpathol.2015.148.

Forment, J. V., A. Kaidi, and S. P. Jackson. 2012. "Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering." *Nat Rev Cancer* 12 (10):663-70. doi: 10.1038/nrc3352.

Furusato, B., C. L. Gao, L. Ravindranath, Y. Chen, J. Cullen, D. G. McLeod, A. Dobi, S. Srivastava, G. Petrovics, and I. A. Sesterhenn. 2008. "Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer." *Mod Pathol* 21 (2):67-75. doi: 10.1038/modpathol.3800981.

Furusato, B., S. H. Tan, D. Young, A. Dobi, C. Sun, A. A. Mohamed, R. Thangapazham, Y. Chen, G. McMaster, T. Sreenath, G. Petrovics, D. G. McLeod, S. Srivastava, and I. A. Sesterhenn. 2010. "ERG oncoprotein expression in prostate cancer: clonal progression of ERG-positive tumor cells and potential for ERG-based stratification." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13 (3):228-37. doi: 10.1038/CaPn.2010.23.

Galán, Edna, Devi Puerto, and Nicolás Villareal. 2015. Manual para la Detección

Temprana del Cáncer de Próstata. En
línea: <https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/Pr%C3%B3stata>.

- Gao, T., Y. Mei, H. Sun, Z. Nie, X. Liu, and S. Wang. 2016. "The association of Phosphatase and tensin homolog (PTEN) deletion and prostate cancer risk: A meta-analysis." *Biomed Pharmacother* 83:114-121. doi: 10.1016/j.biopha.2016.06.020.
- García-Flores, M., I. Casanova-Salas, J. Rubio-Briones, A. Calatrava, J. Domínguez-Escrig, L. Rubio, M. Ramírez-Backhaus, A. Fernández-Serra, Z. García-Casado, and J. A. López-Guerrero. 2014. "Clinico-pathological significance of the molecular alterations of the SPOP gene in prostate cancer." *Eur J Cancer* 50 (17):2994-3002. doi: 10.1016/j.ejca.2014.08.009.
- Geng, C., K. Rajapakshe, S. S. Shah, J. Shou, V. K. Eedunuri, C. Foley, W. Fiskus, M. Rajendran, S. A. Chew, M. Zimmermann, R. Bond, B. He, C. Coarfa, and N. Mitsiades. 2014. "Androgen receptor is the key transcriptional mediator of the tumor suppressor SPOP in prostate cancer." *Cancer Res* 74 (19):5631-43. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0476.
- Ghiam, A. F., R. A. Cairns, J. Thoms, A. Dal Pra, O. Ahmed, A. Meng, T. W. Mak, and R. G. Bristow. 2012. "IDH mutation status in prostate cancer." *Oncogene* 31 (33):3826. doi: 10.1038/onc.2011.546.
- Grasso, CS, YM Wu, DR Robinson, X Cao, SM Dhanasekaran, AP Khan, MJ Quist, Jing X, and Brenner JC Lonigro RJ, Asangani IA, Ateeq B, Chun SY, Siddiqui J, Sam L, Anstett M, Mehra R, Prensner JR, Palanisamy N, Ryslik GA, Vandin F, Raphael BJ, Kunju LP, Rhodes DR, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Tomlins SA. 2012 "The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. ." *Nature* 487 (7406):239-243. doi: 10.1038/nature11125.
- Graça, I., E. Pereira-Silva, R. Henrique, G. Packham, S. J. Crabb, and C. Jerónimo. 2016. "Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer." *Clin Epigenetics* 8:98. doi: 10.1186/s13148-016-0264-8.

- Green, S. M., E. A. Mostaghel, and P. S. Nelson. 2012. "Androgen action and metabolism in prostate cancer." *Mol Cell Endocrinol* 360 (1-2):3-13. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.046.
- Grossmann, M. E., H. Huang, and D. J. Tindall. 2001. "Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 93 (22):1687-97.
- Grupp, K., F. Diebel, H. Sirma, R. Simon, K. Breitmeyer, S. Steurer, C. Hube-Magg, K. Prien, T. Pham, P. Weigand, U. Michl, H. Heinzer, M. Kluth, S. Minner, M. C. Tsourlakis, J. R. Izbicki, G. Sauter, T. Schlomm, and W. Wilczak. 2013. "SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence." *Prostate* 73 (15):1690-8. doi: 10.1002/pros.22707.
- Gurel, B., T. Z. Ali, E. A. Montgomery, S. Begum, J. Hicks, M. Goggins, C. G. Eberhart, D. P. Clark, C. J. Bieberich, J. I. Epstein, and A. M. De Marzo. 2010. "NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors." *Am J Surg Pathol* 34 (8):1097-105. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181e6cbf3.
- Gutierrez-Hartmann, A., D. L. Duval, and A. P. Bradford. 2007. "ETS transcription factors in endocrine systems." *Trends Endocrinol Metab* 18 (4):150-8. doi: 10.1016/j.tem.2007.03.002.
- Haffner, M. C., T. Mosbrugger, D. M. Esopi, H. Fedor, C. M. Heaphy, D. A. Walker, N. Adejola, M. Gürel, J. Hicks, A. K. Meeker, M. K. Halushka, J. W. Simons, W. B. Isaacs, A. M. De Marzo, W. G. Nelson, and S. Yegnasubramanian. 2013. "Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer." *J Clin Invest* 123 (11):4918-22. doi: 10.1172/JCI70354.
- Han, G., G. Buchanan, M. Ittmann, J. M. Harris, X. Yu, F. J. Demayo, W. Tilley, and N. M. Greenberg. 2005. "Mutation of the androgen receptor causes oncogenic

- transformation of the prostate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (4):1151-6. doi: 10.1073/pnas.0408925102.
- Hermans, K. G., A. A. Bressers, H. A. van der Korput, N. F. Dits, G. Jenster, and J. Trapman. 2008. "Two unique novel prostate-specific and androgen-regulated fusion partners of ETV4 in prostate cancer." *Cancer Res* 68 (9):3094-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0198.
- Hernández, S., A. Font-Tello, N. Juanpere, S. de Muga, M. Lorenzo, M. Salido, L. Fumadó, L. Serrano, L. Cecchini, S. Serrano, and J. Lloreta. 2016. "Concurrent TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG rearrangements plus PTEN loss are not found in low grade prostate cancer and define an aggressive tumor subset." *Prostate* 76 (9):854-65. doi: 10.1002/pros.23176.
- Hernández-Llodrà, S., N. Juanpere, S. Muga, M. Lorenzo, J. Gil, A. Font-Tello, L. Agell, R. Albero-González, L. Segalés, J. Merino, L. Serrano, L. Fumadó, L. Cecchini, and J. L. Trull. 2017. "ERG overexpression plus SLC45A3 (prostein) and PTEN expression loss: Strong association of the triple hit phenotype with an aggressive pathway of prostate cancer progression." *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.18266.
- Horbinski, C. 2013. "What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it?" *Acta Neuropathol* 125 (5):621-36. doi: 10.1007/s00401-013-1106-9.
- Huang, C. C., F. M. Deng, M. X. Kong, Q. Ren, J. Melamed, and M. Zhou. 2014. "Re-evaluating the concept of "dominant/index tumor nodule" in multifocal prostate cancer." *Virchows Arch* 464 (5):589-94. doi: 10.1007/s00428-014-1557-y.
- Hughes, S., M. Yoshimoto, B. Beheshti, R. S. Houlston, J. A. Squire, and A. Evans. 2006. "The use of whole genome amplification to study chromosomal changes in prostate cancer: insights into genome-wide signature of preneoplasia associated with cancer progression." *BMC Genomics* 7:65. doi: 10.1186/1471-2164-7-65.
- IARC. 2018. IARC with GLOBOCAN: Cancer Today (2018).

- INC-ESE, Grupo de Vigilancia Epidemiológica del Cáncer. 2006. Cáncer en Cifras: Incidencia por departamento 2000-2006. En línea: www.cancer.gov.co.
- Irshad, S., M. Bansal, M. Castillo-Martin, T. Zheng, A. Aytes, S. Wenske, C. Le Magnen, P. Guarnieri, P. Sumazin, M. C. Benson, M. M. Shen, A. Califano, and C. Abate-Shen. 2013. "A molecular signature predictive of indolent prostate cancer." *Sci Transl Med* 5 (202):202ra122. doi: 10.1126/scitranslmed.3006408.
- Isaacs, J. T., and D. S. Coffey. 1981. "Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma." *Cancer Res* 41 (12 Pt 1):5070-5.
- Jacobsen, S. J., D. J. Jacobson, M. E. McGree, J. L. St Sauver, G. G. Klee, C. J. Girman, and M. M. Lieber. 2012. "Sixteen-year longitudinal changes in serum prostate-specific antigen levels: the olmsted county study." *Mayo Clin Proc* 87 (1):34-40. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.09.002.
- Jhavar, S., D. Brewer, S. Edwards, Z. Kote-Jarai, G. Attard, J. Clark, P. Flohr, T. Christmas, A. Thompson, M. Parker, C. Shepherd, U. H. Stenman, T. Marchbank, R. J. Playford, C. Woodhouse, C. Ogden, C. Fisher, G. Kovacs, C. Corbishley, C. Jameson, A. Norman, J. De-Bono, A. Bjartell, R. Eeles, and C. S. Cooper. 2009. "Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer." *BJU Int* 103 (9):1256-69. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.08200.x.
- Johnson, M. H., A. E. Ross, M. Alshalalfa, N. Erho, K. Yousefi, S. Glavaris, H. Fedor, M. Han, S. F. Faraj, S. M. Bezerra, G. Netto, A. W. Partin, B. J. Trock, E. Davicioni, and E. M. Schaeffer. 2016. "SPINK1 Defines a Molecular Subtype of Prostate Cancer in Men with More Rapid Progression in an at Risk, Natural History Radical Prostatectomy Cohort." *J Urol* 196 (5):1436-1444. doi: 10.1016/j.juro.2016.05.092.

- Jones, M. J., and P. V. Jallepalli. 2012. "Chromothripsis: chromosomes in crisis." *Dev Cell* 23 (5):908-17. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.010.
- Koh, C. M., T. Iwata, Q. Zheng, C. Bethel, S. Yegnasubramanian, and A. M. De Marzo. 2011. "Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *Oncotarget* 2 (9):669-83. doi: 10.18632/oncotarget.327.
- Koochekpour, S. 2011. "Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer." *Iran Red Crescent Med J* 13 (2):80-98.
- Kovtun, I. V., J. C. Cheville, S. J. Murphy, S. H. Johnson, S. Zarei, F. Kosari, W. R. Sukov, R. J. Karnes, and G. Vasmatazis. 2013. "Lineage relationship of Gleason patterns in Gleason score 7 prostate cancer." *Cancer Res* 73 (11):3275-84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2803.
- Kumar-Sinha, C., S. A. Tomlins, and A. M. Chinnaiyan. 2008. "Recurrent gene fusions in prostate cancer." *Nat Rev Cancer* 8 (7):497-511. doi: 10.1038/nrc2402.
- Kunderfranco, P., M. Mello-Grand, R. Cangemi, S. Pellini, A. Mensah, V. Albertini, A. Malek, G. Chiorino, C. V. Catapano, and G. M. Carbone. 2010. "ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer." *PLoS One* 5 (5):e10547. doi: 10.1371/journal.pone.0010547.
- Lapointe, J., C. Li, C. P. Giacomini, K. Salari, S. Huang, P. Wang, M. Ferrari, T. Hernandez-Boussard, J. D. Brooks, and J. R. Pollack. 2007. "Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis." *Cancer Res* 67 (18):8504-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0673.
- Lawson, D. A., Y. Zong, S. Memarzadeh, L. Xin, J. Huang, and O. N. Witte. 2010. "Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (6):2610-5. doi: 10.1073/pnas.0913873107.

- Lee, J. K., J. W. Phillips, B. A. Smith, J. W. Park, T. Stoyanova, E. F. McCaffrey, R. Baertsch, A. Sokolov, J. G. Meyerowitz, C. Mathis, D. Cheng, J. M. Stuart, K. M. Shokat, W. C. Gustafson, J. Huang, and O. N. Witte. 2016. "N-Myc Drives Neuroendocrine Prostate Cancer Initiated from Human Prostate Epithelial Cells." *Cancer Cell* 29 (4):536-547. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.001.
- Leinonen, K. A., O. R. Saramäki, B. Furusato, T. Kimura, H. Takahashi, S. Egawa, H. Suzuki, K. Keiger, S. Ho Hahm, W. B. Isaacs, T. T. Tolonen, U. H. Stenman, T. L. Tammela, M. Nykter, G. S. Bova, and T. Visakorpi. 2013. "Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22 (12):2333-44. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0333-T.
- Leinonen, K. A., T. T. Tolonen, H. Bracken, U. H. Stenman, T. L. Tammela, O. R. Saramäki, and T. Visakorpi. 2010. "Association of SPINK1 expression and TMPRSS2-ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer." *Clin Cancer Res* 16 (10):2845-51. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2505.
- Lippolis, G., A. Edsjö, U. H. Stenman, and A. Bjartell. 2013. "A high-density tissue microarray from patients with clinically localized prostate cancer reveals ERG and TATI exclusivity in tumor cells." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 16 (2):145-50. doi: 10.1038/CaPn.2013.7.
- Liu, W., S. Laitinen, S. Khan, M. Vihinen, J. Kowalski, G. Yu, L. Chen, C. M. Ewing, M. A. Eisenberger, M. A. Carducci, W. G. Nelson, S. Yegnasubramanian, J. Luo, Y. Wang, J. Xu, W. B. Isaacs, T. Visakorpi, and G. S. Bova. 2009. "Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer." *Nat Med* 15 (5):559-65. doi: 10.1038/nm.1944.
- Lochhead, P., A. T. Chan, R. Nishihara, C. S. Fuchs, A. H. Beck, E. Giovannucci, and S. Ogino. 2015. "Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer

- predisposition and progression." *Mod Pathol* 28 (1):14-29. doi: 10.1038/modpathol.2014.81.
- Lotan, T. L., W. Wei, C. L. Morais, S. T. Hawley, L. Fazli, A. Hurtado-Coll, D. Troyer, J. K. McKenney, J. Simko, P. R. Carroll, M. Gleave, R. Lance, D. W. Lin, P. S. Nelson, I. M. Thompson, L. D. True, Z. Feng, and J. D. Brooks. 2016. "PTEN Loss as Determined by Clinical-grade Immunohistochemistry Assay Is Associated with Worse Recurrence-free Survival in Prostate Cancer." *Eur Urol Focus* 2 (2):180-188. doi: 10.1016/j.euf.2015.07.005.
- Lu, David., Jason J. Lee, Allen J. Lee, and Ray M. Lee. 2015. "Development of a New Approach for the therapy of Prostate Cancer with SPOP Mutations." *Journal of Cancer Therapy* 6 (10):841-848. doi: 10.4236/jct.2015.610092.
- Mauzo, S. H., M. Lee, J. Petros, S. Hunter, C. M. Chang, H. K. Shu, A. C. Bellail, C. Hao, and C. Cohen. 2014. "Immunohistochemical demonstration of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation in a small subset of prostatic carcinomas." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22 (4):284-7. doi: 10.1097/PAI.0b013e3182649d1c.
- McDougal, W., Alan. Wein, Louis. Kavoussi, Andrew. Novick, Alan. Partin, Craig. Peters, and Parvati. Ramchandani. 2011. *Early detection, diagnosis and staging of prostate cancer. En: Campbell-Walsh Urology 10th Edition Review 1st Edition.*
- McNeal, J. E., H. M. Price, E. A. Redwine, F. S. Freiha, and T. A. Stamey. 1988. "Stage A versus stage B adenocarcinoma of the prostate: morphological comparison and biological significance." *J Urol* 139 (1):61-5.
- McNeal, J. E., E. A. Redwine, F. S. Freiha, and T. A. Stamey. 1988. "Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread." *Am J Surg Pathol* 12 (12):897-906.

- Mehra, R., S. A. Tomlins, J. Yu, X. Cao, L. Wang, A. Menon, M. A. Rubin, K. J. Pienta, R. B. Shah, and A. M. Chinnaiyan. 2008. "Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer." *Cancer Res* 68 (10):3584-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6154.
- Meigs, J. B., M. J. Barry, J. E. Oesterling, and S. J. Jacobsen. 1996. "Interpreting results of prostate-specific antigen testing for early detection of prostate cancer." *J Gen Intern Med* 11 (9):505-12. doi: 10.1007/bf02599596.
- Melling, N., E. Thomsen, M. C. Tsourlakis, M. Kluth, C. Hube-Magg, S. Minner, C. Koop, M. Graefen, H. Heinzer, C. Wittmer, G. Sauter, W. Wilczak, H. Huland, R. Simon, T. Schlomm, S. Steurer, and T. Krech. 2015. "Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters." *Carcinogenesis* 36 (11):1333-40. doi: 10.1093/carcin/bgv137.
- Minner, S., M. Gärtner, F. Freudenthaler, M. Bauer, M. Kluth, G. Salomon, H. Heinzer, M. Graefen, C. Bokemeyer, R. Simon, G. Sauter, T. Schlomm, and W. Wilczak. 2013. "Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers." *Mod Pathol* 26 (1):106-16. doi: 10.1038/modpathol.2012.130.
- Mondesir, J., C. Willekens, M. Touat, and S. de Botton. 2016. "IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives." *J Blood Med* 7:171-80. doi: 10.2147/JBM.S70716.
- Nagai, N., H. Ohguchi, R. Nakaki, Y. Matsumura, Y. Kanki, J. Sakai, H. Aburatani, and T. Minami. 2018. "Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition." *PLoS Genet* 14 (11):e1007826. doi: 10.1371/journal.pgen.1007826.

- Cancer Genome Atlas Research Network, Cancer Genome Atlas Research. 2015. "The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer." *Cell* 163 (4):1011-25. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.025.
- Nogueira, L., R. Corradi, and J. A. Eastham. 2009. "Prostatic specific antigen for prostate cancer detection." *Int Braz J Urol* 35 (5):521-9; discussion 530-2.
- Nonn, L., V. Ananthanarayanan, and P. H. Gann. 2009. "Evidence for field cancerization of the prostate." *Prostate* 69 (13):1470-9. doi: 10.1002/pros.20983.
- Noushmehr, H., D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara, B. P. Berman, F. Pan, C. E. Pelloski, E. P. Sulman, K. P. Bhat, R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, D. N. Hayes, C. M. Perou, H. K. Schmidt, L. Ding, R. K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L. M. Cope, J. Buckley, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. W. Laird, K. Aldape, and Cancer Genome Atlas Research Cancer Genome Atlas Research Network. 2010. "Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma." *Cancer Cell* 17 (5):510-22. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.017.
- Nupponen, N. N., and T. Visakorpi. 2000. "Molecular cytogenetics of prostate cancer." *Microsc Res Tech* 51 (5):456-63. doi: 10.1002/1097-0029(20001201)51:5<456::AID-JEMT8>3.0.CO;2-H.
- Obralic, N., and B. Kulovac. 2011. "High grade intraepithelial neoplasia of prostate is associated with values of prostate specific antigen related parameters intermediate between prostate cancer and normal levels." *Bosn J Basic Med Sci* 11 (4):223-7.
- Oh WK, Hurwitz M, D'Amico AV, et al. 2003. *Screening for Prostate Cancer*. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Edited by Pollock RE Kufe DW, Weichselbaum RR, et al.,. 6 ed. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13284/>.

- Padmanabhan, A., V. Rao, A. M. De Marzo, and C. J. Bieberich. 2016. "Regulating NKX3.1 stability and function: Post-translational modifications and structural determinants." *Prostate* 76 (6):523-33. doi: 10.1002/pros.23144.
- Paju, A., K. Hotakainen, Y. Cao, T. Laurila, V. Gadaleanu, A. Hemminki, U. H. Stenman, and A. Bjartell. 2007. "Increased expression of tumor-associated trypsin inhibitor, TATI, in prostate cancer and in androgen-independent 22Rv1 cells." *Eur Urol* 52 (6):1670-9. doi: 10.1016/j.eururo.2007.01.096.
- Pardo, Constanza, Esther De Vries, Lina Buitrago, and Óscar Gamboa. 2017. Atlas de Mortalidad por Cáncer en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología ESE – Ministerio de la Protección Social. En línea: https://www.cancer.gov.co/ATLAS_de_Mortalidad_por_cancer_en_Colombi_a.pdf.
- Pfaffl, M. W. 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29 (9):e45.
- Pound, C. R., A. W. Partin, M. A. Eisenberger, D. W. Chan, J. D. Pearson, and P. C. Walsh. 1999. "Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy." *JAMA* 281 (17):1591-7.
- Price, A. J., N. E. Allen, P. N. Appleby, F. L. Crowe, R. C. Travis, S. J. Tipper, K. Overvad, H. Grønbaek, A. Tjønneland, N. F. Johnsen, S. Rinaldi, R. Kaaks, A. Lukanova, H. Boeing, K. Aleksandrova, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, G. Andarakis, D. Palli, V. Krogh, R. Tumino, C. Sacerdote, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. V. Argüelles, M. J. Sánchez, M. D. Chirlaque, A. Barricarte, N. Larrañaga, C. A. González, P. Stattin, M. Johansson, K. T. Khaw, N. Wareham, M. Gunter, E. Riboli, and T. Key. 2012. "Insulin-like growth factor-I concentration and risk of prostate cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (9):1531-41. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0481-T.

- Reiter, J. G., A. P. Makohon-Moore, J. M. Gerold, A. Heyde, M. A. Attiyeh, Z. A. Kohutek, C. J. Tokheim, A. Brown, R. M. DeBlasio, J. Niyazov, A. Zucker, R. Karchin, K. W. Kinzler, C. A. Iacobuzio-Donahue, B. Vogelstein, and M. A. Nowak. 2018. "Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases." *Science* 361 (6406):1033-1037. doi: 10.1126/science.aat7171.
- Renehan, A. G., M. Tyson, M. Egger, R. F. Heller, and M. Zwahlen. 2008. "Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies." *Lancet* 371 (9612):569-78. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.
- Ryan, C. J., A. Smith, P. Lal, J. Satagopan, V. Reuter, P. Scardino, W. Gerald, and H. I. Scher. 2006. "Persistent prostate-specific antigen expression after neoadjuvant androgen depletion: an early predictor of relapse or incomplete androgen suppression." *Urology* 68 (4):834-9. doi: 10.1016/j.urology.2006.04.016.
- Sander, S., L. Bullinger, K. Klapproth, K. Fiedler, H. A. Kestler, T. F. Barth, P. Möller, S. Stilgenbauer, J. R. Pollack, and T. Wirth. 2008. "MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a." *Blood* 112 (10):4202-12. doi: 10.1182/blood-2008-03-147645.
- Schalken, J. A., and G. van Leenders. 2003. "Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology." *Urology* 62 (5 Suppl 1):11-20.
- Schröder, F. H., J. Hugosson, S. Carlsson, T. Tammela, L. Määtänen, A. Auvinen, M. Kwiatkowski, F. Recker, and M. J. Roobol. 2012. "Screening for prostate cancer decreases the risk of developing metastatic disease: findings from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC)." *Eur Urol* 62 (5):745-52. doi: 10.1016/j.eururo.2012.05.068.
- Schröder, F. H., J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L. J. Denis, F. Recker, A. Berenguer, L. Määtänen, C. H. Bangma, G. Aus, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, B. G.

- Blijenberg, S. M. Moss, H. J. de Koning, A. Auvinen, and ERSPC Investigators. 2009. "Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study." *N Engl J Med* 360 (13):1320-8. doi: 10.1056/NEJMoa0810084.
- Sharrocks, A. D. 2001. "The ETS-domain transcription factor family." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (11):827-37. doi: 10.1038/35099076.
- Shen, Chengwu., Jing. Zhang, Mei. Qi, Yannicca. WYChang, and Bo. Han 2014. "Roles of Serine Protease Inhibitor Kazal type 1 (SPINK1) in Prostate Cancer." *Medicinal chemistry* 4 (11):725-728. doi: 10.4172/2161-0444.1000220.
- Shen, M. M. 2013. "Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome." *Cancer Cell* 23 (5):567-9. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.025.
- Shen, M. M., and C. Abate-Shen. 2010. "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes Dev* 24 (18):1967-2000. doi: 10.1101/gad.1965810.
- Showalter, M. R., J. Hatakeyama, T. Cajka, K. VanderVorst, K. L. Carraway, O. Fiehn, and Reproducibility Project: Cancer Biology. 2017. "Replication Study: The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate." *Elife* 6. doi: 10.7554/eLife.26030.
- Silva, M. P., J. D. Barros-Silva, E. Ersvær, W. Kildal, T. S. Hveem, M. Pradhan, J. Vieira, M. R. Teixeira, and H. E. Danielsen. 2016. "Cancer Prognosis Defined by the Combined Analysis of 8q, PTEN and ERG." *Transl Oncol* 9 (6):575-582. doi: 10.1016/j.tranon.2016.08.005.
- Song, H., B. Zhang, M. A. Watson, P. A. Humphrey, H. Lim, and J. Milbrandt. 2009. "Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis." *Oncogene* 28 (37):3307-19. doi: 10.1038/onc.2009.181.

- Sowalsky, A. G., H. Ye, G. J. Bubley, and S. P. Balk. 2013. "Clonal progression of prostate cancers from Gleason grade 3 to grade 4." *Cancer Res* 73 (3):1050-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2799.
- Spratt, D. E., C. Zhang, Z. S. Zumsteg, X. Pei, Z. Zhang, and M. J. Zelefsky. 2013. "Metformin and prostate cancer: reduced development of castration-resistant disease and prostate cancer mortality." *Eur Urol* 63 (4):709-16. doi: 10.1016/j.eururo.2012.12.004.
- St John, J., K. Powell, M. K. Conley-Lacomb, and S. R. Chinni. 2012. "TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression." *J Cancer Sci Ther* 4 (4):94-101. doi: 10.4172/1948-5956.1000119.
- Stenman, U. H. 2012. "Words of wisdom. Re: Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer." *Eur Urol* 62 (4):733-4. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.021.
- Stephens, P. J., C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L. J. Mudie, E. D. Pleasance, K. W. Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal, and P. J. Campbell. 2011. "Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development." *Cell* 144 (1):27-40. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.
- Struewing, J. P., P. Hartge, S. Wacholder, S. M. Baker, M. Berlin, M. McAdams, M. M. Timmerman, L. C. Brody, and M. A. Tucker. 1997. "The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews." *N Engl J Med* 336 (20):1401-8. doi: 10.1056/NEJM199705153362001.
- Tan, Shyh-Han, Nichelle Shah, Ahmed Mohamed, Taduru Sreenath, Gyorgy Petrovics, Albert Dobi, David G. McLeod, Shiv Srivastava, and MD Rockville. 2010. "Down-

- regulation of ERG in prostate cancer cells activates epithelial cell differentiation." *The journal of urology* 183 (4):e504. doi: 10.1016/j.juro.2010.02.888.
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald. 2010. "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer Cell* 18 (1):11-22. doi: 10.1016/j.ccr.2010.05.026.
- Thangapazham, R., F. Saenz, S. Katta, A. A. Mohamed, S. H. Tan, G. Petrovics, S. Srivastava, and A. Dobi. 2014. "Loss of the NKX3.1 tumorsuppressor promotes the TMPRSS2-ERG fusion gene expression in prostate cancer." *BMC Cancer* 14:16. doi: 10.1186/1471-2407-14-16.
- Thompson, I. M., J. J. Ernst, M. P. Gangai, and C. R. Spence. 1984. "Adenocarcinoma of the prostate: results of routine urological screening." *J Urol* 132 (4):690-2.
- Tomlins, S. A., M. Alshalalfa, E. Davicioni, N. Erho, K. Yousefi, S. Zhao, Z. Haddad, R. B. Den, A. P. Dicker, B. J. Trock, A. M. DeMarzo, A. E. Ross, E. M. Schaeffer, E. A. Klein, C. Magi-Galluzzi, R. J. Karnes, R. B. Jenkins, and F. Y. Feng. 2015. "Characterization of 1577 primary prostate cancers reveals novel biological and clinicopathologic insights into molecular subtypes." *Eur Urol* 68 (4):555-67. doi: 10.1016/j.eururo.2015.04.033.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X. W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan. 2005. "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." *Science* 310 (5748):644-8. doi: 10.1126/science.1117679.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, J. Yu, S. Varambally, R. Mehra, S. Perner, F. Demichelis, B. E. Helgeson, B. Laxman, D. S. Morris, Q. Cao, X. Cao, O. Andrén, K. Fall, L.

- Johnson, J. T. Wei, R. B. Shah, H. Al-Ahmadie, J. A. Eastham, S. E. Eggener, S. W. Fine, K. Hotakainen, U. H. Stenman, A. Tsodikov, W. L. Gerald, H. Lilja, V. E. Reuter, P. W. Kantoff, P. T. Scardino, M. A. Rubin, A. S. Bjartell, and A. M. Chinnaiyan. 2008. "The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers." *Cancer Cell* 13 (6):519-28. doi: 10.1016/j.ccr.2008.04.016.
- TY, Chun. 1997. "Coincidence of bladder and prostate cancer." *J Urol.* 157 (1):65-67.
- Varambally, S., Q. Cao, R. S. Mani, S. Shankar, X. Wang, B. Ateeq, B. Laxman, X. Cao, X. Jing, K. Ramnarayanan, J. C. Brenner, J. Yu, J. H. Kim, B. Han, P. Tan, C. Kumar-Sinha, R. J. Lonigro, N. Palanisamy, C. A. Maher, and A. M. Chinnaiyan. 2008. "Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer." *Science* 322 (5908):1695-9. doi: 10.1126/science.1165395.
- Varambally, S., S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan. 2002. "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer." *Nature* 419 (6907):624-9. doi: 10.1038/nature01075.
- Wang, Q., W. Li, X. S. Liu, J. S. Carroll, O. A. Jänne, E. K. Keeton, A. M. Chinnaiyan, K. J. Pienta, and M. Brown. 2007. "A hierarchical Cancer Genome Atlas Research Network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth." *Mol Cell* 27 (3):380-92. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.041.
- Wei, L., J. Wang, E. Lampert, S. Schlanger, A. D. DePriest, Q. Hu, E. C. Gomez, M. Murakam, S. T. Glenn, J. Conroy, C. Morrison, G. Azabdaftari, J. L. Mohler, S. Liu, and H. V. Heemers. 2017. "Intratumoral and Intertumoral Genomic Heterogeneity of Multifocal Localized Prostate Cancer Impacts Molecular Classifications and Genomic Prognosticators." *Eur Urol* 71 (2):183-192. doi: 10.1016/j.eururo.2016.07.008.

- Williamson, S. R., and L. Cheng. 2011. "Potential for targeted therapy in prostate cancers with ERG abnormalities." *Asian J Androl* 13 (6):781-2. doi: 10.1038/aja.2011.100.
- Wolf, A. M., R. C. Wender, R. B. Etzioni, I. M. Thompson, A. V. D'Amico, R. J. Volk, D. D. Brooks, C. Dash, I. Guessous, K. Andrews, C. DeSantis, R. A. Smith, and American Cancer Society Prostate Cancer Advisory Committee. 2010. "American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010." *CA Cancer J Clin* 60 (2):70-98. doi: 10.3322/caac.20066.
- Wu, C., A. W. Wyatt, A. V. Lapuk, A. McPherson, B. J. McConeghy, R. H. Bell, S. Anderson, A. Haegert, S. Brahmhatt, R. Shukin, F. Mo, E. Li, L. Fazli, A. Hurtado-Coll, E. C. Jones, Y. S. Butterfield, F. Hach, F. Hormozdiari, I. Hajirasouliha, P. C. Boutros, R. G. Bristow, S. J. Jones, M. Hirst, M. A. Marra, C. A. Maher, A. M. Chinnaiyan, S. C. Sahinalp, M. E. Gleave, S. V. Volik, and C. C. Collins. 2012. "Integrated genome and transcriptome sequencing identifies a novel form of hybrid and aggressive prostate cancer." *J Pathol* 227 (1):53-61. doi: 10.1002/path.3987.
- Wu, Y. M., M. Cieřlik, R. J. Lonigro, P. Vats, M. A. Reimers, X. Cao, Y. Ning, L. Wang, L. P. Kunju, N. de Sarkar, E. I. Heath, J. Chou, F. Y. Feng, P. S. Nelson, J. S. de Bono, W. Zou, B. Montgomery, A. Alva, D. R. Robinson, A. M. Chinnaiyan, and PCF/SU2C International Prostate Cancer Dream Team. 2018. "Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer." *Cell* 173 (7):1770-1782.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.034.
- Xu, L. L., V. Srikantan, I. A. Sesterhenn, M. Augustus, R. Dean, J. W. Moul, K. C. Carter, and S. Srivastava. 2000. "Expression profile of an androgen regulated prostate specific homeobox gene NKX3.1 in primary prostate cancer." *J Urol* 163 (3):972-9.
- Yang, Y. A., and J. Yu. 2013. "EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer." *Protein Cell* 4 (5):331-41. doi: 10.1007/s13238-013-2093-2.

- Yoshimoto, M., K. Ding, J. M. Sweet, O. Ludkovski, G. Trottier, K. S. Song, A. M. Joshua, N. E. Fleshner, J. A. Squire, and A. J. Evans. 2013. "PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade." *Mod Pathol* 26 (3):435-47. doi: 10.1038/modpathol.2012.162.
- Yu, E. Y., R. Gulati, D. Telesca, P. Jiang, S. Tam, K. J. Russell, P. S. Nelson, R. D. Etzioni, and C. S. Higano. 2010. "Duration of first off-treatment interval is prognostic for time to castration resistance and death in men with biochemical relapse of prostate cancer treated on a prospective trial of intermittent androgen deprivation." *J Clin Oncol* 28 (16):2668-73. doi: 10.1200/JCO.2009.25.1330.
- Yu, J., R. S. Mani, Q. Cao, C. J. Brenner, X. Cao, X. Wang, L. Wu, J. Li, M. Hu, Y. Gong, H. Cheng, B. Laxman, A. Vellaichamy, S. Shankar, Y. Li, S. M. Dhanasekaran, R. Morey, T. Barrette, R. J. Lonigro, S. A. Tomlins, S. Varambally, Z. S. Qin, and A. M. Chinnaiyan. 2010. "An integrated Cancer Genome Atlas Research Network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression." *Cancer Cell* 17 (5):443-54. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.018.
- Zammarchi, F., G. Boutsalis, and L. Cartegni. 2013. "5' UTR control of native ERG and of TMPRSS2-ERG variants activity in prostate cancer." *PLoS One* 8 (3):e49721. doi: 10.1371/journal.pone.0049721.
- Zeegers, M. P., A. Jellema, and H. Ostrer. 2003. "Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis." *Cancer* 97 (8):1894-903. doi: 10.1002/cncr.11262.
- Zoma, M. . Author links open the author workspace., L. . Author links open the author workspace. Curti, D. . Author links open the author workspace. Shinde, A. . Author links open the author workspace. Mitra, D. . Author links open the author workspace. Albino, S. . Author links open the author workspace. Rossi, G. . Author links open the author workspace. Civenni, M. . Author links open the author workspace. Losa, G. . Author links open the author workspace. Thalmann, G. .

Author links open the author workspace. Chiorino, CV. . Author links open the author workspace. Catapano, and GM. Carbone. 2017. A novel epigenetic crosstalk between ERG and EZH2 leads to prostate cancer progression. *Eur Urol Suppl*.

Zuhlke, K. A., A. M. Johnson, S. A. Tomlins, N. Palanisamy, J. D. Carpten, E. M. Lange, W. B. Isaacs, and K. A. Cooney. 2014. "Identification of a novel germline SPOP mutation in a family with hereditary prostate cancer." *Prostate* 74 (9):983-90. doi: 10.1002/pros.22818.