



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis de alteraciones moleculares de *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* en cáncer de próstata de población colombiana y sus posibles implicaciones en el pronóstico

Wendy Johana Montero Ovalle

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

2021

Análisis de alteraciones moleculares de *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* en cáncer de próstata de población colombiana y sus posibles implicaciones en el pronóstico

Wendy Johana Montero Ovalle

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias-Bioquímica

Directora:

Martha Lucía Serrano López

Línea de Investigación:

Biología del cáncer en la población colombiana

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

2021

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Wendy Johana Montero Ovalle

Abril 23 del 2021

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, particularmente a la Facultad de Ciencias y el Departamento de Química, por brindarme la oportunidad de formarme en la institución y aprender de sus docentes en este proceso. También quiero agradecer al Instituto Nacional de Cancerología por abrirme sus puertas y financiar la propuesta aportando, junto con la Universidad, las herramientas necesarias para este proceso de formación.

Agradezco al Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, por acogerme y permitirme desarrollar habilidades en investigación a nivel académico, profesional y personal, a la doctora Alba Lucía Combita por permitirme ser parte del grupo y especialmente a la doctora Carolina Sanabria y a Natalia Acosta por apoyarme, guiarme y asesorarme en el desarrollo del proyecto siempre que lo necesité.

Agradezco a mi madre por brindarme todo su apoyo y acompañarme incondicionalmente desde que decidí emprender este proceso, por brindarme toda su paciencia y fortaleza en las dificultades, siempre ha sido el más grande ejemplo de perseverancia y la razón de la mujer que soy ahora. También agradezco a toda mi familia, especialmente a mi hermana por estar conmigo siempre y apoyarme de todas las maneras durante estos años. A todos ellos dedico este logro.

Agradezco a la profesora Martha Lucía Serrano por depositar su confianza en mí para desarrollar este proyecto y guiarme desde que inicié este proceso de formación, por su acompañamiento profesional y personal tanto en la Universidad como en el Instituto, además por todas sus enseñanzas, por todo el tiempo de dedicación y la paciencia que tuvo, fue una excelente directora y un gran ejemplo para todo lo que quiero lograr en investigación.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos, con los que he podido contar durante todo este tiempo, que a pesar de las dificultades y los momentos complejos siempre me apoyaron y brindaron su mejor versión y me han permitido disfrutar de todo el proceso.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en nuestro país. Los actuales marcadores del pronóstico de la enfermedad no diferencian los casos agresivos de los indolentes con suficiente certeza y por esto se ha trabajado en una caracterización por subtipos moleculares que permita tener una mejor clasificación. En CaP localizado de diferentes poblaciones se han detectado fusiones entre el gen regulado por andrógenos *TMPRSS2* y *ERG* y mutaciones en genes como *SPOP* (speckle type POZ, el gen que codifica para una proteína adaptadora del complejo Cullin-3-RING-Box1), *FOXA1* (factor de transcripción de Forkhead box-A1) e *IDH1* (isocitrato deshidrogenasa 1), estas han sido relacionadas con el pronóstico; sin embargo, no se conoce la frecuencia y la relevancia de estas alteraciones en los pacientes con CaP en nuestro país.

En el presente estudio fueron evaluadas la fusión *TMPRSS2-ERG* y las mutaciones en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* en muestras de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) de prostatectomías radicales de 112 pacientes con CaP, para determinar la frecuencia de estos subtipos y correlacionarlos con parámetros clínico-patológicos. La fusión fue detectada en 71 pacientes (63,4%), esta frecuencia del subtipo *ERG* fue similar a la observada en población caucásica (40-66%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de recurrencia bioquímica de acuerdo con el seguimiento, entre 1-3 meses una gran proporción de pacientes con presencia de fusión tuvieron recurrencia bioquímica (40%) comparados con pacientes con ausencia (4,8%) ($p=0,014$). No se encontraron diferencias significativas entre otras variables clínico-patológicas y el estado de fusión. En los 41 (36,6%) casos negativos para la fusión, dos pacientes (4,9%) presentaron mutaciones de cambio de sentido con pérdida de función, en el exón 6 (p.F102C - c.305T>G) y en el exón 7 (p.F133L - c.399C>G) de *SPOP*, teniendo en cuenta todos los casos del estudio la presencia de este subtipo fue del 1,8%. La baja frecuencia de este subtipo en colombianos se podría explicar por la reportada variabilidad en la frecuencia de estas mutaciones según la población (5%-20%). No se encontraron mutaciones en *FOXA1* en ninguna de las muestras analizadas. No fue posible

estandarizar las técnicas para el análisis de las mutaciones de *IDH1* en las muestras FFPE.

Palabras clave: *SPOP*, *FOXA1*, *IDH1*, Alteraciones moleculares, Cáncer, Neoplasia prostática, Biomarcador, Pronóstico.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the type of cancer with the highest incidence and mortality in our country. Current disease prognostic markers do not differentiate aggressive from indolent cases with sufficient certainty, and for this reason a characterization by molecular subtypes has been worked on that allow for a better classification. In localized PCa from different populations, fusions have been detected between the gene regulated by androgens *TMPRSS2* and *ERG* and mutations in genes such as *SPOP* (Speckle type POZ, the gene that codes for an adapter protein of the Cullin-3-RING-Box1 complex), *FOXA1* (Forkhead box-A1 transcription factor) and *IDH1* (Isocitrate dehydrogenase 1), these have been related to prognosis; however, the frequency and relevance of these alterations in patients with PCa in our country is not known.

In the present study, the *TMPRSS2-ERG* fusion and the mutations in *SPOP*, *FOXA1*, and *IDH1* were evaluated in samples of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues from radical prostatectomies of 112 patients with PCa, to determine the frequency of these subtypes. and correlate them with clinicopathological parameters. Fusion was detected in 71 patients (63.4%), this frequency of the *ERG* subtype was similar to that observed in the Caucasian population (40-66%). Statistically significant differences were found in the time of biochemical recurrence according to the follow-up, between 1-3 months a large proportion of patients with presence of fusion had biochemical recurrence (40%) compared with patients with absence (4.8%) ($p=0.014$). No significant differences were found between other clinicopathological variables and the state of fusion. In the 41 (36.6%) fusion-negative cases, two patients (4.9%) had missense mutations with loss of function, in exon 6 (p.F102C - c.305T> G) and in exon 7 (p.F133L - c.399C> G) of *SPOP*, taking all

cases in this study, the presence of this subtype was 1.8%. The low frequency of this subtype in Colombians could be explained by the reported variability in the frequency of these mutations according to the population (5%-20%). No FOXA1 mutations were found in any of the samples tested. Techniques for the analysis of IDH1 mutations in FFPE samples could not be standardized.

Keywords: *SPOP*, *FOXA1*, *IDH1*, Molecular alterations, Cancer, Prostatic neoplasia, Biomarker, Prognosis.

Contenido

	Pág.
1. Planteamiento del problema	3
2. Justificación	5
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Marco teórico	9
4.1 Generalidades del cáncer de próstata.....	9
4.2 Carcinogénesis en cáncer de próstata	14
4.3 Tamizaje y detección temprana del cáncer de próstata	16
4.4 Clasificación histopatológica del cáncer de próstata	17
4.5 Estadificación.....	18
4.6 Indicadores actuales de pronóstico	22
4.7 Tratamiento del cáncer de próstata	24
4.8 Subtipos moleculares de cáncer de próstata.....	27
5. Metodología	51
5.1 Diseño del estudio	51
5.2 Definición de sujetos de estudio	52
5.3 Procedimientos	53
5.4 Plan de análisis.....	59
6. Resultados	61
6.1 Características clínico-patológicas de los pacientes	61
6.2 Detección de fusiones TMPRSS2-ERG	63
6.3 Extracción de ADN de tejidos FFPE.....	64
6.4 Detección de mutaciones de SPOP	64
6.5 Análisis de mutaciones en SPOP en múltiples focos	69
6.6 Detección de mutaciones de FOXA1.....	70
6.7 Detección de mutaciones de IDH1	72
6.8 Asociación del estado de fusión TMPRSS2-ERG con parámetros clínico-patológicos	77
7. Discusión	81
8. Conclusiones y perspectivas	85
8.1 Conclusiones	85
8.2 Perspectivas	86

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Conformación anatómica de la próstata..	10
Figura 2. Tasas de Incidencia y mortalidad ajustadas por edad de los cánceres más frecuentes en el mundo y en Colombia..	12
Figura 3. Cambios fenotípicos y microambientales y cambios moleculares a través de un modelo de carcinogénesis de cáncer de próstata.	14
Figura 4. Clasificación de Gleason.	17
Figura 5. Taxonomía molecular basada en siete conductores oncogénicos de cáncer de próstata	27
Figura 6. Subfamilias y miembros de la familia de factores de transcripción ETS.	28
Figura 7. Fusión TMPRSS2-ERG	29
Figura 8. Estructura y función de la proteína SPOP.	32
Figura 9. Mutaciones puntuales del dominio MATH en SPOP en cáncer de próstata..	37
Figura 10. Posibles intervenciones terapéuticas en tumores con alteraciones de SPOP, según mecanismos de acción.....	40
Figura 11. Estructura de la proteína FOXA1.....	41
Figura 12. Mutaciones puntuales recurrentes en el dominio Forkhead de FOXA1	44
Figura 13. Estructura y puntos de mutación de la proteína IDH1	48
Figura 14. Proceso enzimático de IDH1 de tipo silvestre y mutado	49
Figura 15. Hibridación de las sondas en TMPRSS2 y ERG y resultados posibles mediante FISH.....	54
Figura 16. Resultados de FISH de 4 pacientes	63
Figura 17. Estandarización de PCR exón 6 y exón 7 de <i>SPOP</i>	64
Figura 18. Secuencias del exón 6 y exón 7 de <i>SPOP</i> .	65
Figura 19. Amplificación del exón 6 y exón 7 de <i>SPOP</i> en muestras FFPE de cáncer de próstata	67
Figura 20. Mutaciones en <i>SPOP</i> en muestras FFPE de CaP.....	67
Figura 21. Amplificación de exón 6 y 7 de <i>SPOP</i> en muestras FFPE tumorales y no tumorales de los casos con mutaciones (042 y 079).....	70
Figura 22. Estandarización de PCR del exón 2 de <i>FOXA1</i> .	71
Figura 23. Amplificación de exón 2 de <i>FOXA1</i> (246 pb) en muestras FFPE de cáncer de próstata.....	72
Figura 24. Estandarización de PCR del exón 4 de IDH1 (180 pb)	74
Figura 25. PCR del exón 4 de IDH1 (180 pb) a partir de cDNA	75

Figura 26. Estandarización de PCR del exón 4 de <i>IDH1</i> (499 pb).....	77
Figura 27. Análisis de supervivencia según el estado de fusión.....	79

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Principales sistemas de estratificación de riesgo a recurrencia en cáncer de próstata previo a tratamiento.	23
Tabla 2. Sustratos de SPOP en CaP clasificados por función.	34
Tabla 3. Descripción de los primers y las condiciones de tm utilizadas para la amplificación mediante PCR.	57
Tabla 4. Cuantificación de ADN de muestras extraídas. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes.	61
Tabla 6. Asociación del estado de fusión con parámetros clínico-patológicos.	78

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

ACS	American Cancer Society/Sociedad Americana del Cáncer
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASTRO	American Society for Radiation Oncology
BET	Bromodomain and Extraterminar Domain
RA	Receptor de Andr6genos
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CaP	Cáncer de Pr6stata
CPGEA	Chinese Prostate Cancer and Epigenome Atlas
CPRC	Cáncer de Pr6stata Resistente a la Castraci6n
BCR	Biochemical Recurrence
DRE	Digital Rectal Exam/Exámen Rectal Digital
ERG	ETS related gene 1
ETS	E-26 transformation-Specific/Factores de transcripci6n de transformaci6n específica E-26
ETS+	Casos con presencia de fusi6n TMPRSS2-ERG
ETS-	Casos con ausencia de fusi6n TMPRSS2-ERG
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded/Tejido fijado en formalina y embebido en parafina
FOXA1	Forkhead box protein A1
GG	Grade Group Gleason/Grupo de Grado Gleason
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HGPIN	High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia/Neoplasia Intraepithelial Prostática de Alto Grado
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1/Isocitrato Deshidrogenasa 1
MATH	Homología Meprin y TRAF-C Domain
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NKX3.1	NK3 Homeobox 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSA	Prostatic Specific Antigen/Antígeno Prostático Específico
SRC3	Nuclear Receptor Coactivator 3
SPOP	Speckle-type Poz Protein
TAE	Tasa de incidencia ajustada por edad
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2

Introducción

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y se prevé que en los próximos 20 años, la cantidad de nuevos casos aumente en un 70% [1]. Uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia es el cáncer de próstata (CaP), siendo el segundo más común y el sexto con mayor mortalidad a nivel mundial [2]. En Colombia cada año se generan más de 12.712 casos y mueren cerca de 3.166 hombres por esta razón [3], convirtiéndolo en el cáncer con mayor incidencia y mortalidad del país.

Existen algunas estrategias de tamizaje como el Antígeno Prostático Específico (PSA, por sus siglas en inglés), un biomarcador que ha aumentado la detección de CaP principalmente en estadios tempranos. El valor establecido para recomendar biopsia es de $> 4,0$ ng/mL, sin embargo, se ha sobreestimado su confiabilidad debido a la sensibilidad (86-93%) y baja especificidad (24-30%), ya que también aumenta su expresión cuando se presentan otras enfermedades en próstata como la hiperplasia benigna de próstata, o la prostatitis [4,5]. Por otro lado, con el fin de determinar el pronóstico, se desarrolló la clasificación de Gleason, que permite evaluar la agresividad del CaP basada en los grados de diferenciación del tejido, teniendo en cuenta la multifocalidad del tumor [6,7], esto de la mano con la reciente clasificación de los grados y el puntaje mediante grupo de grado Gleason (GG) [8], [9]. Pese al uso de la clasificación de D'Amico, en donde se evalúa el riesgo de recurrencia bioquímica, mediante los niveles de PSA, el puntaje de Gleason y el estadio clínico de los pacientes [10–12], no se cuenta en la actualidad con una manera de determinar con suficiente certeza el curso de la enfermedad, por lo cual, se ha venido trabajando en subtipos moleculares que permitan mejorar la clasificación de los pacientes con respecto al pronóstico mediante biomarcadores asociados [6,13–18].

Estudios de CaP localizado realizados en diferentes poblaciones han logrado detectar alteraciones moleculares predominantes como fusiones en los genes que codifican para

factores de transcripción de la familia ETS y el gen regulado por andrógenos TMPRSS2, una de las fusiones más frecuentes es TMPRSS2-ERG con una presencia entre el 9-66% de los CaP [6,17–21]. En los casos en los que la fusión está ausente, se han encontrado otro tipo de alteraciones como mutaciones en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* con una frecuencia entre el 5-20%, 4-41% y 1% respectivamente [17,22,23]. *SPOP* (speckle type POZ), actúa como una proteína adaptadora en el complejo Ubiquitin ligasa E3 Cullin-3 RING-box1 (BTB-CUL3-Rbx1) [6,18,24–31]. *FOXA1* (factor de transcripción de Forkhead box-A1) es un activador transcripcional de múltiples genes [6,32,33]. En cuanto a *IDH1* (isocitrato deshidrogenasa 1), es la enzima encargada de catalizar la descarboxilación oxidativa de isocitrato [34–36].

Las mutaciones en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* se han relacionado con factores pronóstico en distintas poblaciones [6,18,20,37–43], pero esto se desconoce en nuestro país, por lo cual, es importante evaluar la presencia de estos subtipos y correlacionar estos hallazgos con parámetros clínico-patológicos.

1.Planteamiento del problema

Estudios genéticos del CaP han revelado numerosas alteraciones del ADN implicadas en la desregulación de genes que participan en la modificación de la cromatina, la regulación del ciclo celular, el desarrollo de la próstata por la señalización de andrógenos, entre otros procesos [6,44–47].

En los últimos años se han tratado de establecer alteraciones moleculares que brinden información sobre la progresión del CaP y que contribuyan a la determinación del pronóstico de la enfermedad, por tal motivo, se ha planteado una clasificación por subtipos moleculares, asociada a eventos que podrían direccionar el curso de la enfermedad. Estos hallazgos han brindado una mayor comprensión sobre el riesgo asociado y la heterogeneidad del CaP, lo que podría favorecer una atención guiada a las necesidades del paciente, mejorando significativamente su diagnóstico y tratamiento.

Dentro de las alteraciones moleculares más frecuentes se han detectado fusiones en la familia ETS como TMPRSS2-ERG, y otras excluyentes de fusiones, como mutaciones puntuales en los genes *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*. Se ha sugerido que dichas alteraciones cumplen un papel importante en la progresión de la enfermedad y podrían contribuir a la diferenciación de CaP indolente y agresivo lo que contribuiría de manera importante a la elección de un adecuado manejo terapéutico [6,17,43,18,20,37–42].

2. Justificación

El CaP es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en nuestro país [3]. Recientemente se ha observado que los CaP pueden ser de tipo indolente que no requieren tratamiento, o de tipo agresivo que deben someterse a tratamientos como prostatectomía radical o radioterapia. Dentro de los casos que se diagnostican como CaP indolente, existen pacientes mal clasificados que necesitan ser tratados, pero también se encuentran pacientes diagnosticados con CaP agresivo que realmente sean casos indolentes y no necesitan un tratamiento sino únicamente seguimiento, y debido a su clasificación errónea van a sufrir los efectos secundarios de un tratamiento que no era necesario [4,47].

De acuerdo con esto se ha observado que las herramientas de tamizaje y diagnóstico o los sistemas de clasificación de riesgo a recurrencia bioquímica como el de D'Amico, en donde se tienen en cuenta los niveles de PSA, el puntaje de Gleason y el estadio clínico, no diferencian con suficiente certeza los casos agresivos de los indolentes [10–12]. Por tal motivo, se ha venido trabajando en establecer una clasificación por subtipos moleculares que pueda contribuir a determinar el pronóstico de la enfermedad, favoreciendo la integración de estos hallazgos con la atención guiada a las necesidades del paciente, mejorando el diagnóstico y brindando un tratamiento adecuado [6,13,14,45,48]. Dentro de las alteraciones moleculares del CaP se han detectado una serie de mutaciones en genes como *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* los cuales, se ha sugerido que cumplen un papel importante en la progresión de la enfermedad y podrían contribuir a la diferenciación de CaP de tipo indolente y de tipo agresivo [6,18,20,37–43].

Sin embargo, en población colombiana aún no conocemos de estudios que aborden estos subtipos moleculares, por lo que se considera de gran importancia para contribuir al entendimiento y a los avances clínicos de la enfermedad en el país. Por tal motivo, en este estudio se propone determinar en pacientes con CaP los tres subtipos moleculares

anteriormente mencionados y analizar su relación con parámetros propios de la enfermedad, además de dilucidar el papel que cumplen en la historia natural del CaP.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar algunas alteraciones moleculares de los genes *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* presentes en pacientes con CaP, para definir la presencia de subtipos y correlacionar estos hallazgos con parámetros clínico-patológicos.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los subtipos *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* en pacientes con CaP.
2. Correlacionar los subtipos moleculares con parámetros clínico-patológicos del CaP.
3. Evaluar la presencia de las mutaciones en HGPIN para determinar el momento de aparición de la alteración en la carcinogénesis prostática.

4. Marco teórico

4.1 Generalidades del cáncer de próstata

4.1.1 Glándula prostática

La próstata es una glándula masculina encargada de producir parte del fluido seminal. Se encuentra debajo de la vejiga y adyacente a la vesícula seminal, separando el conducto eyaculador de la uretra [15]. Está conformada por 3 zonas distintas (Figura 1); la zona central que contiene el tubo ductal desde la vesícula seminal hasta donde se encuentra con la uretra descendente, la zona periférica que está situada en la parte posterior de la glándula y la zona de transición, la cual está directamente debajo de la vejiga y rodea la uretra. Las células epiteliales que conforman la próstata se distribuyen en luminales (60%), basales (40%) y células madre (1%). La glándula aumenta de tamaño con la edad y puede causar enfermedades comunes como prostatitis, hiperplasia prostática pero también puede generar neoplasias. Debido a la heterogeneidad del tejido se pueden presentar lesiones multifocales [49].

La formación y el funcionamiento de la próstata depende en gran medida de los andrógenos testiculares, como la testosterona, androsterona y androstenediona, por los cuales se da la proliferación y supervivencia de las células prostáticas. Las células de Leyding son las encargadas de producir hasta el 95% de los andrógenos, de los cuales el 95% es testosterona. La síntesis de andrógenos inicia en el hipotálamo, que secreta la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), que estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis y esta a su vez induce la síntesis de testosterona en las células de Leyding. Una vez producida, la testosterona es liberada al torrente sanguíneo de forma libre, unida a la albúmina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) e ingresa a las células prostáticas, allí es convertida a su forma activa dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa y se une al receptor

de andrógenos, el cual activado, ingresa al núcleo y genera la transcripción de genes involucrados en proliferación y supervivencia [50–52].

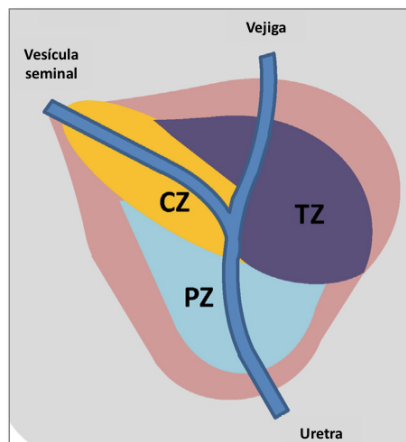


Figura 1. Conformación anatómica de la próstata. Compuesta por 3 zonas, una zona central (CZ), una zona periférica (PZ) y una zona transicional (TZ). Tomado y modificado de [51].

Los niveles de testosterona van aumentando gradualmente en la pubertad llevando a un equilibrio en el crecimiento de la glándula en la edad adulta. Por el envejecimiento, los niveles de testosterona séricos disminuyen llevando a un desequilibrio en la proliferación de células prostáticas, sin embargo, los motivos de esta inestabilidad aún son inciertos y a pesar de que esto puede influir en el crecimiento anormal de la glándula prostática, esta desregulación en la testosterona no es el único factor que determina la formación de hiperplasia prostática o cáncer en hombres [50].

4.1.2 Tipos de cáncer de próstata

Existen diferentes tipos de cáncer que se pueden formar en la próstata dependiendo del tipo de célula en el que se origina, pueden ser adenocarcinomas, tumores neuroendocrinos, carcinomas de células transicionales, carcinomas de células pequeñas o sarcomas [53–55].

- Adenocarcinomas: Este es el tipo más frecuente con una aparición hasta del 99% de todos los CaP. Son desarrollados a partir de células glandulares especializadas

en la secreción. Puede ser de tipo ductal o acinar, siendo este último el más frecuente [54–56].

- Tumores neuroendocrinos: Inician en células neuroendocrinas y no producen algunas proteínas como PSA, y son independientes de andrógenos, son poco frecuentes y se desarrollan lentamente, pero es posible que al momento del diagnóstico se hayan diseminado a otros tejidos, pueden aparecer en casos de CaP con tumores resistentes a terapia hormonal [54–56].
- Carcinomas de células transicionales: Se originan en las células que recubren la uretra, es poco frecuente que inicien en la próstata, normalmente se generan en la vejiga y se disemina a la próstata [54,55].
- Carcinomas de células pequeñas: Esta conformado por células pequeñas y redondas, crecen más rápidamente que otros tipos y comúnmente se detectan cuando en cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo [54,55].
- Carcinomas de células escamosas: Se generan de células planas que recubren el tejido prostático, suelen crecer y diseminarse de forma rápida [54,55].
- Sarcomas: Es desarrollado a partir de células de tejido conectivo, es un tipo muy agresivo que suele detectarse en estadios avanzados dado su crecimiento acelerado [54,55].

4.1.3 Carga de enfermedad

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y se prevé que en los próximos 20 años, la cantidad de nuevos casos aumente en un 70% [1]. Uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia es el cáncer de próstata (CaP), siendo el segundo más común y el sexto con mayor mortalidad a nivel mundial (Figura 2A) [2].

Las tasas ajustadas por edad (TAE x 100.000) de incidencia más altas se encuentran en Oceanía, América del Norte y Europa, mientras que África y Asia muestran tasas de incidencia menores (Figura 2B). Las tasas de mortalidad más altas se encuentran en el Sur de África, América Central, seguidas por Australia, Nueva Zelanda y Europa Occidental (Figura 2C). Se estima que las regiones con mayor incidencia y mortalidad de CaP para el 2040 serán África, Asia y América Latina [3,57].

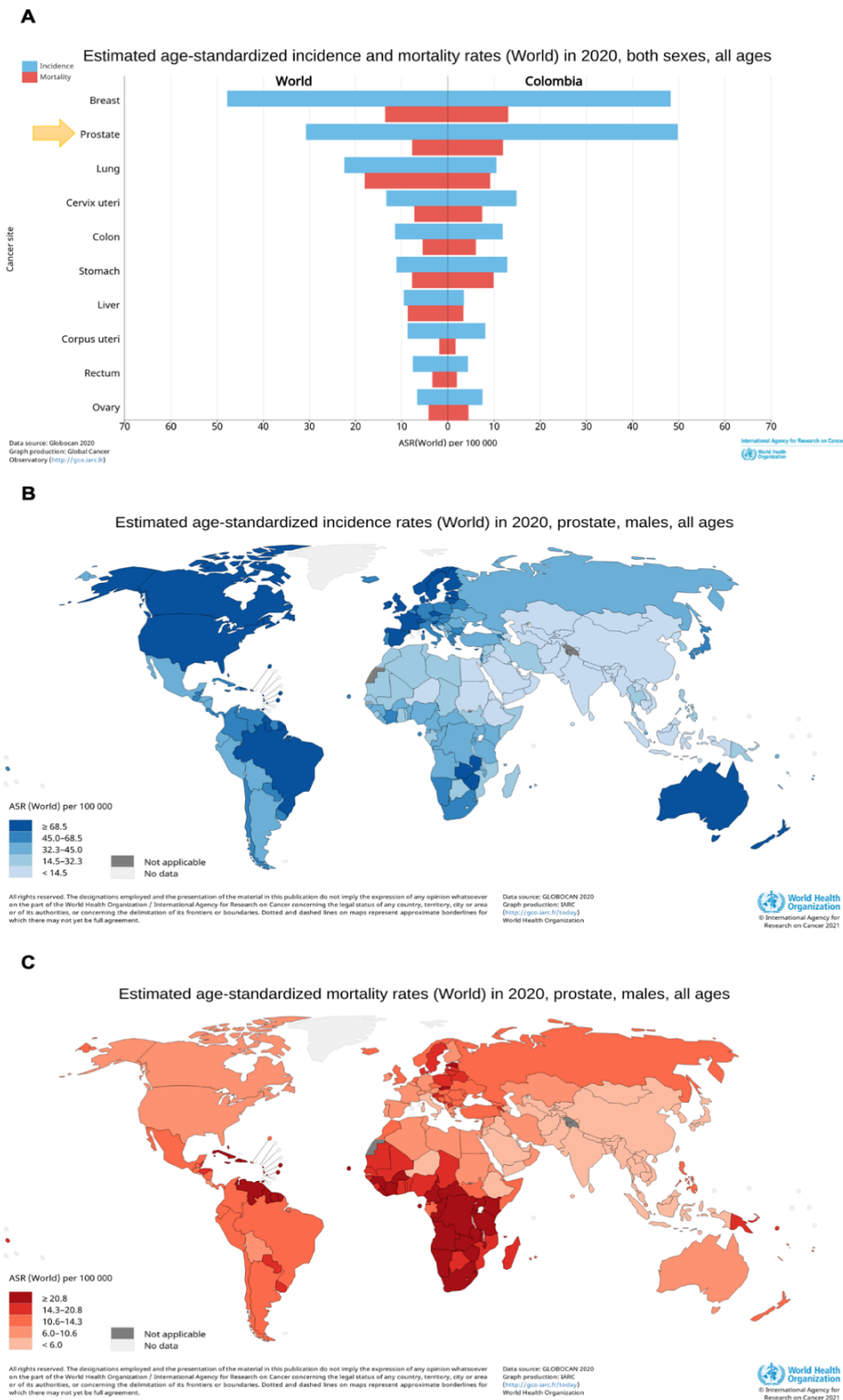


Figura 2. A Tasas de Incidencia y mortalidad ajustadas por edad de los cánceres más frecuentes en el mundo y en Colombia. La flecha amarilla indica el cáncer de próstata. **B.** Tasas de incidencia de cáncer de próstata en el mundo por país. **C.** Tasas de mortalidad de cáncer de próstata en el mundo por país. Tomado de Globocan 2020.

En Colombia cada año se generan más de 12.712 casos y mueren cerca de 3.166 hombres por esta razón [3], convirtiéndolo en el cáncer con mayor incidencia y el segundo con mayor mortalidad del país (Figura 2A). Según las cifras del grupo de Vigilancia Epidemiológica del Instituto Nacional de Cancerología ESE y del Atlas de Mortalidad por Cáncer en Colombia [58,59], los departamentos con mayor tasa de incidencia y mortalidad de CaP por edad (TAE x 100.000), son San Andrés y Providencia, Cesar, Atlántico y Valle del Cauca y otros en menor medida como Arauca, Bogotá, Meta y Norte de Santander [58,59].

Las regiones en las que la incidencia y mortalidad son más bajas son Amazonas, Guainía, Guaviare, Vaupés, Putumayo y Nariño, las variaciones de incidencia y mortalidad entre las diferentes regiones podría deberse a las proporciones de ancestría y al alto grado de mestizaje originado de la diversidad poblacional, sin embargo, esto aún no ha sido asociado en nuestro país. Por otro lado, las diferencias también podrían estar sujetas al acceso a la prueba del antígeno prostático específico (PSA) que puede generar un sobrediagnóstico sin tener implicaciones directas en la mortalidad y esto de la mano con las limitaciones del acceso a los servicios de salud en las diferentes regiones del país [58,59].

4.1.4 Factores de riesgo

Se han propuesto algunos factores de riesgo predominantes para el CaP como la edad avanzada, los cambios hormonales e inflamatorios, los antecedentes familiares, alteraciones moleculares como mutaciones somáticas o polimorfismos y la etnicidad o ancestría en donde se presenta mayor incidencia y mortalidad en poblaciones con ascendencia africana comparada con poblaciones caucásicas o asiática [57,60,61].

También se han asociado otras características como el sobrepeso/obesidad, estimando fracciones atribuibles poblacionales para CaP avanzado [62], adicionalmente se ha encontrado una asociación entre la dieta dependiente de las condiciones ambientales y la incidencia de CaP, países industrializados con una alta incidencia poseen una dieta rica en grasa animal (30-40%), un alto consumo de grasas saturadas y productos lácteos, caso contrario ocurre en países asiáticos en donde la incidencia es menor y la dieta se basa en un alto consumo de proteína vegetal como la soya y un bajo consumo de grasa animal

[57,60,63]. Además, se ha encontrado que dietas ricas en calcio (>1.5 g por día) aumentan el riesgo de CaP en 27% y en un 32% en casos de CaP avanzado y agresivo [64]. Otro factor que aumenta el riesgo es el consumo de carnes rojas o procesadas como lo indicó la IARC [65] y como se ha encontrado en países como Uruguay y Argentina, principales consumidores de carnes [19,63,66,67]. A pesar de esto, aún no se ha logrado identificar el origen etiológico del CaP, como si es claro en cáncer de pulmón o cáncer de cérvix.

4.2 Carcinogénesis en cáncer de próstata

Como en otros tipos de cáncer, el CaP se desarrolla a través de cambios genéticos y epigenéticos lo que desencadena la activación de oncogenes y la inactivación de supresores tumorales, además se asocia la inestabilidad genética con la progresión tumoral [17,68].

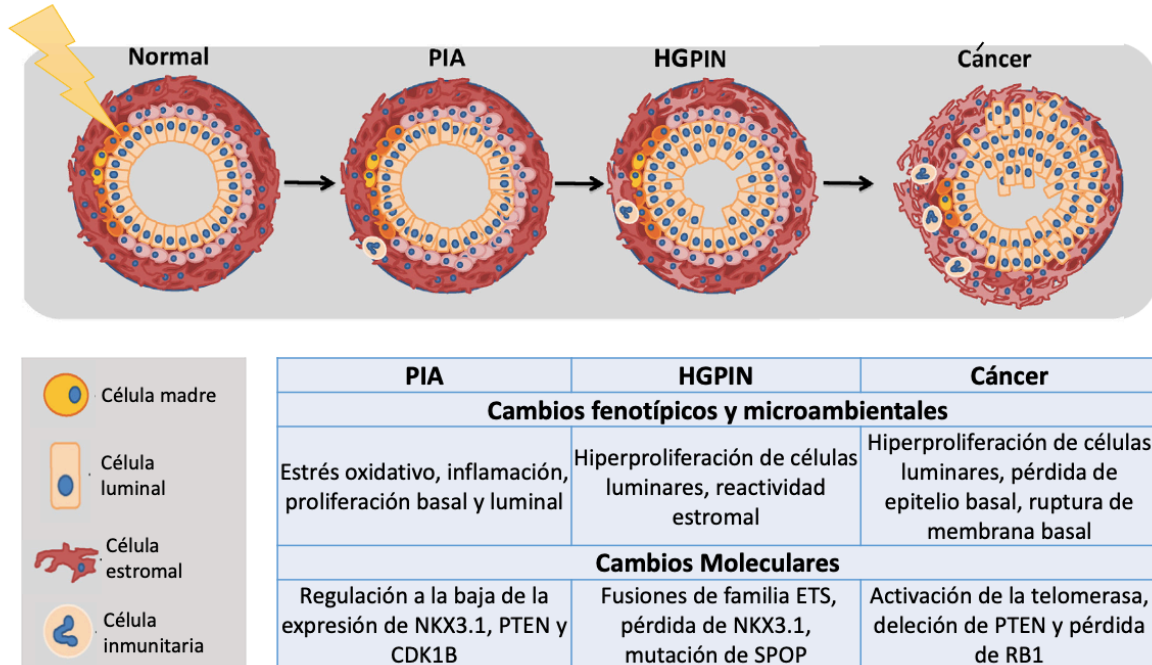


Figura 3. Cambios fenotípicos y microambientales y cambios moleculares a través de un modelo de carcinogénesis de cáncer de próstata. PIA: Atrofia Inflamatoria Proliferativa, HGPIN: Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado. Tanto PIA como HGPIN se consideran lesiones en la evolución del CaP. Tomado y modificado de [49].

La secuencia de carcinogénesis de CaP está representada en la Figura 3. Existen algunas lesiones neoplásicas en próstata como la Atrofia Inflamatoria Proliferativa (PIA) y la Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado (HGPIN) en las que se evidencian cambios progresivos como alteración en el linaje epitelial, incremento celular inadecuado o presencia de alteraciones moleculares como regulación a la baja de la expresión de NKX3.1, PTEN y CDK1B, en el caso de PIA, o fusiones de familia ETS, pérdida de NKX3.1, mutación de *SPOP* en HGPIN. Los CaP, presentan hiperproliferación de células luminales, interrupción o ausencia de la membrana basal, estroma reactivo y cambios genéticos como coactivación de la telomerasa, delección de PTEN y pérdida de RB1 que ayudan al crecimiento tumoral [49,69,70].

Posteriormente, las células pueden continuar proliferando hasta traspasar la membrana basal e invadir ganglios linfáticos o hacer metástasis en otros órganos, convirtiéndose en CaP avanzado. También puede ocurrir que el tumor sigue creciendo incluso cuando se realiza ablación de andrógenos y la cantidad de estos en el cuerpo se reduce a niveles muy bajos, esto se denomina cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), que es de mal pronóstico [71,72]. Hasta el momento no se conocen los mecanismos exactos que conducen a la resistencia, pero se ha sugerido el modelo de selección clonal y el modelo adaptativo y ambos podrían involucrar alteraciones moleculares como mutaciones en el receptor de andrógenos, amplificaciones o variantes de splicing [72–74].

Por otro lado, se ha caracterizado el CaP como un tumor muy heterogéneo ya que presenta múltiples focos de progresión en un mismo órgano, que se originan presuntamente de manera independiente, esto asociado a un modelo de evolución clonal [49]. En este modelo se propone la ocurrencia de un evento de iniciación que perturba un oncogén o un supresor tumoral, luego se da una transición en la que la célula gana alteraciones genéticas irreversibles y finalmente se da la progresión por la mitosis que genera células propensas a una proliferación tumoral activa (Figura 3). La variabilidad genética con distintas mutaciones en la nueva progenie o mutagénesis secuencial, lleva a establecer subcampos que conducen a tumores primarios multifocales con ventajas fenotípicas [75]. El origen clonal que dará paso a la mutagénesis secuencial se da en células madre, las cuales presentan un lento recambio y una baja actividad explicando la pausada progresión y manifestación tardía del CaP [75].

4.3 Tamizaje y detección temprana del cáncer de próstata

Es recomendado para el caso de CaP realizar detección temprana de oportunidad en hombres mayores de 50 años, asintomáticos, que acudan a consulta por diferentes causas. La tamización de oportunidad debe realizarse con una frecuencia ≥ 5 años, con tacto rectal con el fin de encontrar anomalías palpables y debe acompañarse de la medición de los niveles ajustados por edad del Antígeno Prostático Específico (PSA) [76,77], una glicoproteína serín proteasa cuya función principal es la licuefacción del semen [78]. Para el caso de pacientes que presenten niveles de PSA alterados pero un tacto rectal normal, se recomienda la repetición de la prueba en los siguientes 6 meses. Los niveles de PSA normales dependen de la edad del paciente, sin embargo, el valor establecido para recomendar biopsia es $\geq 4,0$ ng/ml [76,77]. En cuanto a la prueba, se ha sobreestimado su confiabilidad debido a la sensibilidad (86-93%) y baja especificidad (24-30%), ya que también aumenta su expresión cuando se presentan otras enfermedades en próstata como la hiperplasia benigna de próstata o la prostatitis [4,5]. El PSA ha aumentado la detección de CaP principalmente en estadios tempranos.

Teniendo en cuenta lo anterior, actualmente se emplean otros conceptos como densidad de PSA, velocidad de PSA y PSA libre frente al PSA unido o complejo. En el primer caso se tiene en cuenta el volumen de la próstata mediante el uso de ecografía transrectal (TRUS) y se relaciona con el valor de PSA sérico para obtener la densidad, valores altos se asocian a neoplasias prostáticas mientras que valores bajos a hiperplasias benignas. En el segundo caso se toma en cuenta la tasa de cambio de PSA con respecto al tiempo evaluando así la velocidad de incremento de PSA, cuando los valores aumentan de manera considerable en vez de permanecer constantes se considera indicativo de CaP. Finalmente, también son analizados los niveles de PSA libre en comparación con PSA total teniendo en cuenta el PSA unido o complejo, ya que un porcentaje bajo de PSA libre en suero se ha asociado a CaP en comparación con lesiones benignas. A pesar de estos esfuerzos, aún existen demasiadas limitaciones en el uso de estas pruebas para aumentar la especificidad de este biomarcador [4,5,78–80].

4.4 Clasificación histopatológica del cáncer de próstata

Por otro lado, con el fin de determinar el pronóstico, se desarrolló la clasificación de Gleason, que se realiza inicialmente en la biopsia sobre la cual se determina el diagnóstico por medio de un análisis histopatológico y estos resultados junto con los datos del PSA y el análisis clínico permiten la determinación del tratamiento más adecuado para el paciente. Esta clasificación está basada en los grados de diferenciación del tejido, de 1 a 5, en donde Gleason 1 corresponde al mejor diferenciado y se correlaciona con el pronóstico más favorable, mientras que Gleason 5 es el menos diferenciado y se correlaciona con un mal pronóstico (Figura 4A). Teniendo en cuenta la multifocalidad del tumor, el puntaje de Gleason es el resultado de la suma de los dos patrones más abundantes y abarca rangos entre 2 ($1 + 1 = 2$) y 10 ($5 + 5 = 10$) (Figura 4B) siendo dos el menos agresivo y diez el más agresivo, no obstante, los valores reportados actualmente comprenden valores de Gleason desde 6 ($3+3=6$) [7,46].

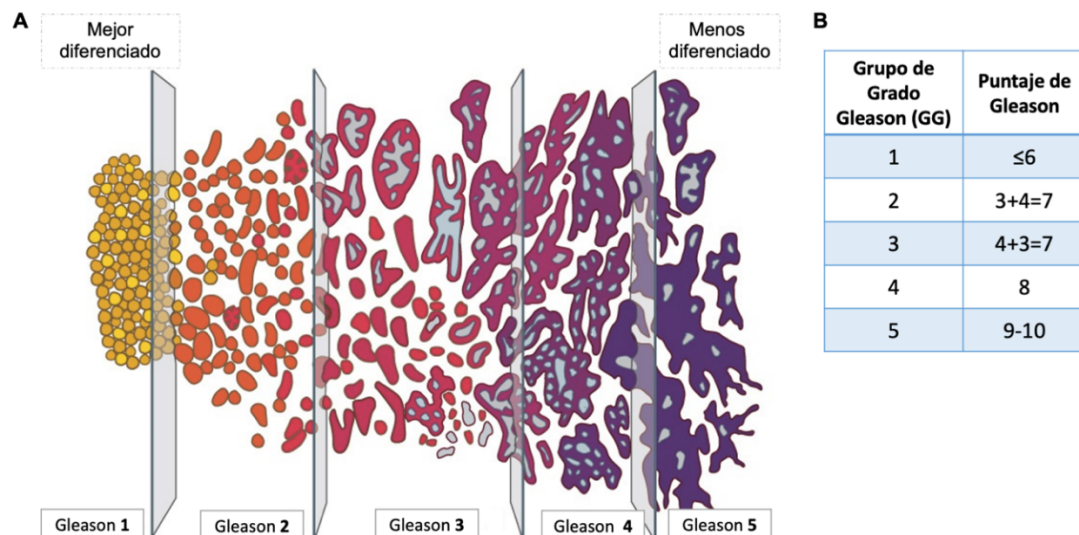


Figura 4. Clasificación de Gleason. A. Patrones de Gleason: Corresponden a Gleason 1-5 teniendo en cuenta la diferenciación del tejido, donde 1 es el más diferenciado (izquierda) y 5 el menos diferenciado (derecha). B. Puntaje de Gleason: Suma de los dos patrones más abundantes (primario y secundario) y clasificación por Grupos de Grado Gleason (GG) basado en la importancia del patrón predominante y tomando en cuenta el puntaje total, brindando una mejor correlación con el pronóstico. Tomado y modificado de [7,22,46,81].

Recientemente, se ha desarrollado una clasificación por grupos de grado (GG), teniendo en cuenta los puntajes de Gleason más significativos según la evidencia [81]. Estos grupos están formados de la siguiente manera: GG 1: puntaje de Gleason ≤ 6 ; GG 2: puntaje de Gleason $3 + 4 = 7$; GG 3: puntaje de Gleason $4 + 3 = 7$; GG 4: puntaje de Gleason y finalmente, GG 5: puntaje de Gleason 9-10 (Figura 4B) [22]. Esta clasificación ha tomado un valor pronóstico importante, ya que se sugiere que los pacientes que hacen parte del GG 1 presentan un pronóstico favorable y podrían únicamente tener seguimiento, mientras que para los clasificados en el GG 5, el pronóstico es crítico y podría llevar a un tratamiento inmediato como terapia hormonal, prostatectomía radical o radioterapia, adicionalmente tiene un impacto importante en la clasificación de pacientes con puntaje de Gleason 7, ya que mediante los GG, se logra diferenciar entre GG2 (3+4) y GG3 (4+7) [8,22,82].

4.5 Estadificación

Según el “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) [83] y la “American Society of Clinical Oncology” (ASCO) [84], la determinación del estadio es una forma de describir el crecimiento o diseminación del cáncer teniendo en cuenta algunas características según el tejido. Esta clasificación es empleada para el diagnóstico de los pacientes con CaP ya que brinda información valiosa sobre la progresión de la enfermedad. Existen dos tipos de estadios que se pueden establecer para un paciente teniendo en cuenta la información y la muestra con la que se cuente, estos son el estadio clínico y el estadio patológico. Conocer esta información ayuda al médico a decidir sobre la mejor opción de tratamiento y evaluar el pronóstico del paciente.

- **Estadio clínico:** Se basa en la información obtenida previa al tratamiento, como los resultados del examen rectal digital (DRE), el valor del PSA, los grados y el puntaje de Gleason. Estos datos ayudan a establecer si se requieren exámenes adicionales como radiografías, gammagrafías óseas, exploraciones por CT o resonancias y en conjunto esto permite determinar el estadio clínico.

- **Estadio patológico:** Se basa en la información obtenida durante la cirugía y en los resultados de la lectura histopatológica del tejido prostático extirpado. Por lo general, se extirpa toda la próstata y algunos ganglios linfáticos que agregan información sobre el estadio patológico.

4.5.1 Sistema TNM para la determinación del estadio

La estadificación se realiza mediante el sistema TNM, en donde los médicos evalúan toda la información a su alcance para establecer qué tan grande y donde está ubicado el tumor primario (T), si el tumor se ha diseminado a ganglios linfáticos (N, por la sigla en inglés de node) y de ser así en dónde y en qué medida y si el cáncer ha hecho metástasis (M) en otras partes del cuerpo, de ser así en dónde y en qué medida.

- **Tumor (T):** Se emplea T más una letra o número (0 a 4) para describir el tamaño y la ubicación del tumor, los estadios pueden tener subgrupos que ayuden a describir las características más detalladamente. Si el T hace referencia a un estadio clínico se expresa como cT y cuando describe un estadio patológico se indica como pT.

Clasificación T clínico (cT)

-TX: No se puede evaluar el tumor primario.

-T0: No hay evidencia del cáncer en la próstata.

-T1: El tumor no puede sentirse durante un DRE y no se observa durante las pruebas por imágenes. Puede encontrarse al hacer una cirugía por otra razón como para la hiperplasia prostática benigna o por un crecimiento anormal de células no cancerosas.

T1a: El tumor está en el 5% o menos de tejido prostático.

T1b: El tumor está en más del 5% del tejido prostático.

T1c: El tumor se encontró durante la biopsia con aguja, en general porque el paciente presenta un nivel de PSA elevado.

-T2: El tumor se encuentra en la próstata y no en otras partes del cuerpo, es palpado en la 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.

T2c: El tumor ha crecido a ambos lados de la próstata.

-T3: El tumor ha crecido a través de la próstata 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, se denomina como extensión extraprostática.

T3b: El tumor invadió la(s) vesícula(s) seminal(es).

-T4: El tumor está fijo o está creciendo hacia el interior de estructuras adyacentes diferentes a las vesículas seminales.

Clasificación T patológico (pT)

No existe clasificación TX, T0 o T1 para el pT en CaP.

-T2: El tumor se encuentra solo en la próstata.

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.

T2c: El tumor ha crecido a ambos lados de la próstata.

-T3: Hay extensión extraprostática en uno o ambos lados de la próstata.

T3a: Hay extensión extraprostática 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 crece hacia el interior de estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales.

- **Ganglio (N):** Se emplea N para representar la diseminación o no a ganglios linfáticos. Los ganglios que se encuentran cerca de la próstata en el área pélvica se denominan regionales y los que están ubicados en otras partes del cuerpo son distantes.

-NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

-N0: El cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos regionales.

-N1: El cáncer se diseminó a uno o varios ganglios linfáticos regionales.

- **Metástasis (M):** Se usa M para indicar si el cáncer invadió otras partes del cuerpo como los pulmones o los huesos, se denomina metástasis a distancia.

-MX: No se puede evaluar la metástasis a distancia.

-M0: El cáncer no ha hecho metástasis.

-M1: Hay metástasis a distancia.

M1a: El cáncer se diseminó a uno o varios ganglios linfáticos regionales o distantes.

M1b: El cáncer se diseminó a los huesos.

M1c: El cáncer se diseminó a otra parte del cuerpo con invasión o no de hueso

4.5.2 Agrupación de los estadios del cáncer

Los estadios son asignados al combinar las clasificaciones T, N y M, además incluyen los niveles de PSA y el grupo grado de Gleason.

- **Estadio I:** En este caso en cáncer normalmente tiene un crecimiento lento. El tumor no se puede palpar y comprende la mitad o menos de un lado de la próstata, los niveles de PSA son bajos y las células cancerosas están diferenciadas (cT1a-cT1c o cT2a o cT2, N0, M0, PSA <10 ng/ml y GG1).
- **Estadio II:** El tumor se encuentra solo en la próstata, los niveles de PSA son medios (10-20 ng/ml) o bajos (<10 ng/ml), CaP en este estadio es pequeño, pero puede tener mayor riesgo a crecer y diseminarse.
 - Estadio IIA:** El tumor no se puede palpar, comprende la mitad o menos de la próstata, PSA es medio y las células cancerosas están bien diferenciadas (cT1a-cT1c o cT2a-cT2c o pT2, N0, M0, PSA entre 10 y 20 ng/ml y GG1).
 - Estadio IIB:** El tumor se puede palpar, niveles de PSA medios y las células cancerosas están moderadamente diferenciadas (T1-T2, N0, M0, PSA entre 10-20 ng/ml y GG2).

-Estadio IIC: El tumor se puede palpar, niveles de PSA medios y las células cancerosas están moderada o escasamente diferenciadas (T1-T2, N0, M0, PSA entre 10-20 ng/ml y GG3-GG4).

- **Estadio III:** Los niveles de PSA son altos, el tumor está creciendo y el cáncer es de alto grado, indicando 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 tejidos adyacentes, niveles de PSA altos (T1-T2, N0, M0, 20 ng/ml o más y cualquier GG).

-Estadio IIIB: el tumor ha crecido fuera de la glándula prostática y puede haber invadido estructuras cercanas (T3-T4, N0, M0, cualquier PSA y cualquier GG).

-Estadio IIIC: Las células cancerosas están escasamente diferenciadas (cualquier T, N0, M0, cualquier PSA y GG5).

- **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 GG).

-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 GG).

- **Recurrente:** Es cuando el cáncer reaparece después del tratamiento. Puede reaparecer en la próstata o en otra parte del cuerpo, si esto ocurre, se realizan pruebas para determinar el alcance de la recurrencia.

4.6 Indicadores actuales de pronóstico

Para determinar el pronóstico de los pacientes con CaP, actualmente se definen una serie de modelos predictivos de tratamiento previo, como tablas de consulta, nomogramas, gráficas de probabilidad, redes neuronales, entre otros, que usan combinaciones de los

valores de factores pronósticos clásicos como PSA inicial, puntuación de Gleason de la biopsia y estadio T clínico. Uno de los más utilizados es la clasificación de D'Amico por grupos de riesgo de recurrencia bioquímica posterior a prostatectomía radical o radioterapia (Tabla 1) [10–12,85].

Tabla 1. Principales sistemas de estratificación de riesgo a recurrencia en cáncer de próstata previo a tratamiento.

Institución/ Organización	Riesgo muy bajo	Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto	Riesgo muy alto
Harvard D'Amico	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6 -T1c -Cáncer en < 3 biopsias o en ≤ 50% en cada biopsia	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6 -T1a-T2a	-PSA 10-20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason = 7 y/o -T2b o T2c	-PSA ≥ 20 ng/ml o -Puntaje de Gleason 8-10 o -T3a	-PSA ≥ 20 ng/ml -Gleason 5 o más de 4 biopsias con Puntaje de Gleason 8-10 -T3b o T4
NCCN	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6(GG1) -T1c -En < de 3 biopsias y ≤ 50% en cada biopsia	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6 (GG1) -T1-T2a	-PSA >10-20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason 7 y/o -T2b o T2c Favorable : GG2 * El cáncer se encuentra en <50% de la biopsia Desfavorable: GG2 o GG3	-PSA >20 ng/ml o -Puntaje de Gleason 8-10 (GG4 o GG5) o -T3a	-Gleason 5 o más de 4 biopsias con Puntaje de Gleason 8-10 (GG4 o GG5) -T3b-4
NICE	-	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6 -T1-T2a	-PSA ≤ 20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason ≤ 7 y/o -T1-T2	-PSA > 20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason 8-10 ≥ T3a	-
EAU AUA	-PSA ≤ 10 ng/ml - Puntaje de Gleason ≤ 6 (GG1) -T1-T2a -El cáncer se encuentra en <34% de la biopsia	-PSA ≤ 10 ng/ml -Puntaje de Gleason ≤ 6 (GG1) -T1-T2a	-PSA >10-20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason = 7 (GG2 o GG3) y/o -T2b-c	-PSA ≥ 20 ng/ml y/o -Puntaje de Gleason 8-10 (GG4 o GG5) ≥ T3	-

Existen otras estratificaciones de riesgo como las propuestas por la Red Nacional de Cáncer Integral (NCCN, EE.UU), el Instituto Nacional de Salud y Excelencia Clínica (NICE, Reino Unido), la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), la Asociación

Americana de Urología (AUA) y la Asociación Europea de Urología (EAU), las cuales se han actualizado conforme se amplía el conocimiento de la enfermedad [85–93].

4.7 Tratamiento del cáncer de próstata

Existen diferentes tipos de tratamiento para el CaP cuya elección depende de diferentes factores como el tipo y la etapa del cáncer, los posibles efectos secundarios, la edad y salud general del paciente, entre otros [94].

4.7.1 Tratamiento de acuerdo a los estadios en cáncer de próstata

- **Estadios I y II: Cáncer de próstata en estadio temprano**

En este caso el cáncer crece muy lentamente y puede tardar años en generar algún síntoma o problema de salud relacionado, por esta razón se recomienda la vigilancia activa. Se puede sugerir radioterapia o prostatectomía radical en los casos en donde los puntajes de Gleason sean altos, ya que puede progresar de una manera más rápida. La “American Society of Clinical Oncology (ASCO)”, la “American Society for Radiation Oncology (ASTRO)” y la “Society of Urologic Oncology” recomiendan que los hombres con CaP en estadio temprano de alto riesgo que no se haya diseminado a otras partes del cuerpo deben tratarse mediante prostatectomía radical o radioterapia con terapia de supresión de testosterona [93,94].

- **Estadio III: Cáncer de próstata localmente avanzado**

En este estadio el paciente puede tratarse con radioterapia de haz externo, terapia de supresión de testosterona o cirugía. Estos tratamientos pueden combinarse para evitar el crecimiento y propagación del cáncer, normalmente se suministra el medicamento para la supresión de testosterona entre 18-24 meses. También podría recomendarse vigilancia activa en hombres que no presenten síntomas o aquellos que tienen una enfermedad más

grave o tienen una edad avanzada. Los casos que presenten extensión extraprostática, se sugiere una radioterapia adyuvante posterior a la prostatectomía radical [93,94].

Algunos pacientes pueden presentar cánceres avanzados que no se hayan diseminado a otras partes del cuerpo pero que su crecimiento no se haya detenido a pesar de los bajos niveles de testosterona, esto se conoce como cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico, la ASCO refiere tratamiento con orquidectomía y el uso de medicamentos que reduzcan los niveles de testosterona, se pueden realizar seguimientos de PSA entre 3-6 meses y exámenes adicionales como gammagrafía ósea, tomografía computarizada o resonancia magnética [94].

- **Estadio IV: Cáncer de próstata avanzado**

Los cánceres de alto riesgo o localmente avanzados tienen una mayor probabilidad de avanzar y convertirse en cáncer metastásico, en estas situaciones el tratamiento de los pacientes depende del criterio médico, ya que no existe una cura para este punto de progresión, pero se pueden establecer tratamientos que prolonguen la vida. Cuando el paciente presenta síntomas crónicos y efectos secundarios graves generalmente se brinda atención de apoyo o cuidados paliativos, algunos como resección transuretral para controlar síntomas de sangrado y obstrucción urinaria, radioterapia intravenosa o en áreas específicas para aliviar el dolor en los huesos o el uso de medicamentos que fortalezcan los huesos [94,95].

Para el caso de pacientes con CaP metastásico sensible a hormonas el cual se ha diseminado a otras partes del cuerpo pero aún es sensible a terapia de privación de andrógenos, se puede emplear terapia de supresión de testosterona, pero dependerá del estado de salud del paciente y la extensión del cáncer ya que los efectos secundarios son fuertes [94,96].

El cáncer metastásico que adicionalmente es resistente a la castración o independiente de andrógenos (CPRC), además de haberse diseminado a otras partes del cuerpo, no se detiene con niveles de testosterona bajos (< 50 ng/ml) por lo que puede ser difícil de tratar. El CPRC se caracteriza además por un aumento en los niveles de PSA, empeoramiento de

los síntomas y el crecimiento o progresión del cáncer que puede ser identificado por exploración imagenológica como gammagrafía ósea, resonancia magnética, tomografía computarizada, entre otros. La ASCO recomienda continuar con el uso de inhibidores del receptor de andrógenos y también se puede incluir terapia dirigida, quimioterapia o inmunoterapia [94,95].

4.7.2 Remisión y recurrencia

Posterior a tratamientos de la enfermedad puede producirse una remisión cuando el cáncer no se detecta en el cuerpo y no existen síntomas. Sin embargo, la remisión puede ser temporal o permanente. Comúnmente, después prostatectomía radical, orquidectomía o radioterapia los niveles de PSA disminuyen, por el contrario, si estos niveles aumentan, puede referirse a una reaparición del cáncer y esto se denomina recurrencia bioquímica (BCR, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, puede existir una recurrencia clínica cuando el cáncer reaparece en la próstata, en tejidos o ganglios cerca de la próstata o en otras partes del cuerpo como los huesos o pulmones. Si ocurre la recurrencia se deberán considerar tratamientos adicionales para el manejo de la enfermedad, dependiendo del tipo de recurrencia y su localización [94,96].

4.7.3 Recurrencia bioquímica

Cerca del 20-40% de los pacientes tratados con prostatectomía radical y entre el 30-50% de los sometidos a radioterapia desarrollan BCR al menos a 10 años. Se considera recurrencia bioquímica cuando el valor de PSA es $\geq 0,2$ ng/ml y estos niveles van aumentando con el tiempo. Esto puede ser una indicación de una progresión tumoral incluso a metástasis, no obstante, pueden ocurrir BCR sin encontrar rastros de tumor en el cuerpo. El pronóstico de estos pacientes dependerá de su estadio, el tiempo transcurrido de la BCR, la edad, comorbilidades, entre otros [53,96,97]. Los pacientes con este tipo de recurrencia usualmente reciben radioterapia de rescate o criocirugía con tratamiento sistémico como el uso de inhibidores del receptor de andrógenos o tratamiento de supresión de testosterona, pero esto dependerá de la situación y características tanto del paciente como del tumor. A pesar de las opciones existentes, no existe una estrategia de tratamiento exacta ni el tiempo de administración [94,95].

4.8 Subtipos moleculares de cáncer de próstata

En busca de una clasificación molecular del CaP que permita una mejor comprensión de la enfermedad, diferentes estudios han explorado la posibilidad de encontrar alteraciones moleculares excluyentes o subtipos que puedan asociarse con pronóstico y que permitan guiar la elección de un tratamiento más adecuado y oportuno para los pacientes. El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) ha logrado establecer en CaP primario siete subtipos moleculares que describen el 74% de los tumores examinados (Figura 5A).

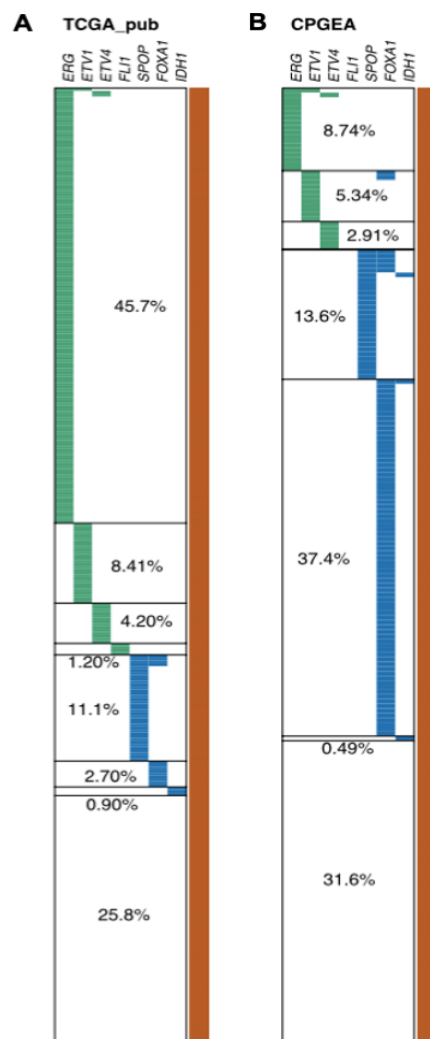


Figura 5. Taxonomía molecular basada en siete conductores oncogénicos de cáncer de próstata. A. Resultados obtenidos por el Atlas del genoma del cáncer (TCGA). **B.** Resultados según el análisis del Atlas del genoma y epigenoma chino (CPGEA). Tomado de [17,98].

De estos subtipos, cuatro están caracterizados por fusiones en factores de transcripción de la familia ETS como *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FLI1*, por lo cual se clasifican como ETS+ y por otro lado, tres subtipos definidos por mutaciones en genes como *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*, ya que son excluyentes de las fusiones se denominan ETS- [17]. También se han evaluado subtipos cuyos cambios de expresión desencadenan progresión en CaP como la sobreexpresión de *EZH2* [99–104], sobreexpresión de *SPINK1* [105,106] y baja expresión de *NKX3.1* [107–109], además eventos asociados al control inmune como la inactivación de *CDK12* [110,111]. Estos subtipos se han asociado a pronóstico en diferentes estadios de la enfermedad.

4.8.1 Subtipos ETS+

La familia de factores de transcripción específica de transformación de eritoblastos o E26 (ETS), está conformada por 12 subfamilias y 28 genes en humanos involucrados en el control del ciclo celular, diferenciación, proliferación, remodelación de tejidos y angiogénesis. Cada uno de estos factores de transcripción comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado de 85 aminoácidos que forman tres α -hélices y cuatro láminas β , sin embargo, la actividad de unión de este dominio es específica de cada gen (Figura 6) [23,107].

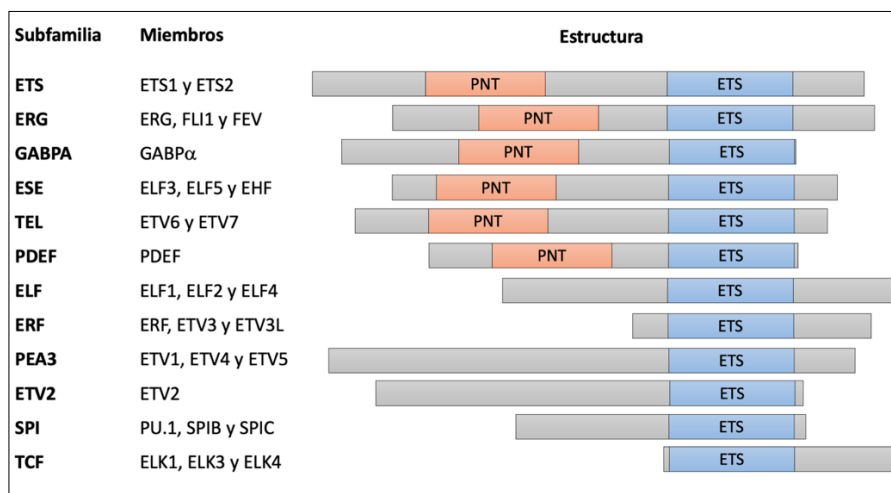


Figura 6. Subfamilias y miembros de la familia de factores de transcripción ETS. Dominios de ADN conservados (ETS, azul) y dominios de represión transcripcional PNT (Pointed, naranja). Tomado de [23].

Estos factores de transcripción son propensos a sufrir de rearrreglos cromosómicos, cambio en el número de copias y amplificaciones mediante translocaciones o deleciones, esto como se ha encontrado en tumores sólidos y algunos hematológicos. El análisis del genoma en CaP ha revelado fusiones entre la serin proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) regulada por andrógenos y miembros de la familia ETS como ERG, ETV1, ETV4 y ETV5, dejando los exones codificantes de estos bajo el control de elementos que responden al receptor de andrógenos de TMPRSS2, conduciendo a la sobreexpresión de las proteínas involucradas [23,112,113]. Estas fusiones se consideran un evento temprano en la carcinogénesis presente desde las lesiones HGPIN [23]. Una de las fusiones más frecuentes es TMPRSS2-ERG con una presencia entre el 9-66% de los CaP dependiendo de la población, siendo mayor para hombres caucásicos entre 40-66%, y menor para asiáticos entre 9-27% y africanos entre 25-31% [17,20,98,114,115]. En Colombia recientemente ha sido evaluada la expresión de ERG en 53 focos de CaP de 20 pacientes colombianos, encontrando sobreexpresión en el 52,8% de los focos analizados [116].

ERG es activado por eventos de fusión génica a partir de deleciones y/o translocaciones, colocándolo bajo el control de promotores inducibles por hormonas masculinas, con mayor frecuencia las regiones reguladoras del gen TMPRSS2, lo cual conduce a una expresión elevada de ERG (Figura 7) [13]. El estado de fusión puede analizarse mediante ensayos de expresión de ERG, sin embargo, la técnica comúnmente utilizada y de mayor fiabilidad es la hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas específicas para ERG y TMPRSS2 [21,117–121].

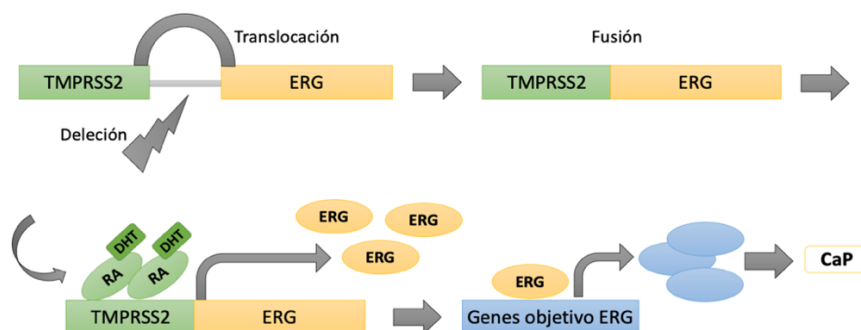


Figura 7. Fusión TMPRSS2-ERG. La fusión favorece la expresión elevada de ERG que es inducida por el receptor de andrógenos al localizarse en regiones reguladoras del gen TMPRSS2. ERG es un activador transcripcional y participa en eventos de proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, inflamación y apoptosis, por lo que una expresión desregulada ocasionar una lesión precancerosa como HGPIN. RA: receptor de andrógenos. DHT: dihidrotestosterona.

- **Relación de la fusión con pronóstico**

Se ha observado que la presencia o ausencia de estas fusiones es un determinante importante para la clasificación pronóstica en CaP, sin embargo, existen resultados controversiales al respecto, ya que algunos estudios han revelado que presencia de fusión esta asociada a un estadio tumoral superior, compromiso de ganglios linfáticos, menor tiempo hasta la recurrencia bioquímica, altos niveles de PSA preoperatorio y supervivencia menor, refiriéndolo a un peor pronóstico [21,114,121,122], pero por otro lado se ha encontrado una relación entre la presencia de fusión y un puntaje de Gleason menor y un tiempo mayor hasta la recurrencia bioquímica, lo que podría indicar un pronóstico favorable [115,120,123]. Adicionalmente, en algunos casos no se ha encontrado ninguna asociación a pronóstico [119,124].

4.8.2 Subtipos ETS-

- **Mutaciones en SPOP**

- **Estructura**

La proteína SPOP, se identificó por primera vez en 1997 como una proteína nuclear con patrón de tipo moteado (speckle) [125]. Esta proteína es codificada por el gen *SPOP*, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 17 posición q21.33, posee 79280 pb y 16 exones. Tiene una isoforma denominada SPOPL (SPOP like) que se encuentra codificada en el locus 2q22.1, está conformada por 12 exones y un total de 71778 pb [126] (Figura 8A). SPOPL comparte una identidad del 85% de la secuencia proteica de SPOP, pero posee 18 a.a. adicionales, sugiriendo que la isoforma podría cumplir funciones similares, aunque como veremos más adelante también parece cumplir un papel en la modulación de la función de SPOP [38,127].

La proteína SPOP, está conformada por 374 a.a, tiene un peso de 43,13 KDa y su estructura secundaria consta de 18 α -hélice y 14 láminas β , que forman tres dominios principales, un dominio N-terminal MATH, en la región de 28-166 a.a, un dominio interno

BTB, conocido como POZ (proteína virus de pox y dedos de zinc) en 186-300 a.a y un dominio BACK en 300-359 a.a, que permite la formación de complejos estructurales, además su región c-terminal funciona como secuencia de localización nuclear (NLS) (Figura 8B) [127,128]. Se ha evidenciado que SPOP puede encontrarse en una conformación dimérica u oligomérica que incrementa la unión a los sustratos (Figura 8C).

- Dominio MATH (homología Meprin y TRAF-C)

Dentro del complejo ubiquitin ligasa E3 cullin-3 RING-Box1 (Cul3-RING-Box1), el dominio MATH de la proteína adaptadora SPOP cumple la función crucial de reclutar al sustrato (Figura 8D). Los sustratos de SPOP conservan en su estructura al menos un motivo consenso de unión (SBC) del tipo $\phi/\pi/ST/ST/ST$ (ϕ representa un residuo no polar y π un residuo polar) que permite la afinidad y especificidad del reconocimiento por MATH [128,129], [130]. SPOP forma una hendidura en MATH mediante los residuos Y87, F102, Y123, W131 y F133 que rodean la cadena lateral hidrofóbica del sustrato, adicionalmente se generan puentes de hidrógeno que involucran principalmente los residuos Y87 y D130 y de los residuos polares del SBC, el residuo S en la posición 3 parece ser un requisito importante, ya que se posiciona dentro de una pequeña bolsa formada por K129, D130 y W131 [127,128]. Se han encontrado mutaciones puntuales con pérdida de función en estos residuos, lo que exhibe la importancia de estos en la unión a sustrato. Existen otros residuos del dominio MATH en donde se han encontrado mutaciones puntuales con pérdida de función como E47, E50, M117, R121, D140, entre otros, sin embargo, no se ha determinado una relación específica de interacción con el sustrato [6,18,29,32,131–134].

- Dominio BTB (Bric-a-brac/Tamtrack/Broad)

Por medio del dominio BTB, SPOP se une al complejo Cullin3 (Figura 8D) a través de dos puntos de interacción, uno dado por las hélices H2 y H5 de Cul3 y otro mediante un motivo central de tipo $\phi-x-E$ (ϕ es un residuo hidrofóbico, x es un residuo no conservado) del bucle α -3 y β -4 de SPOP, en donde el mayor aporte de interacción se da por este último [127]. El dominio BTB también permite la formación de homodímeros SPOP-SPOP o heterodímeros SPOP-SPOPL mediante interacciones hidrofóbicas entre hélices α -1, α -2 y α -3 del dominio y una parte de la región N-terminal. Estos dímeros pueden reconocer dos motivos SBC del sustrato [127].

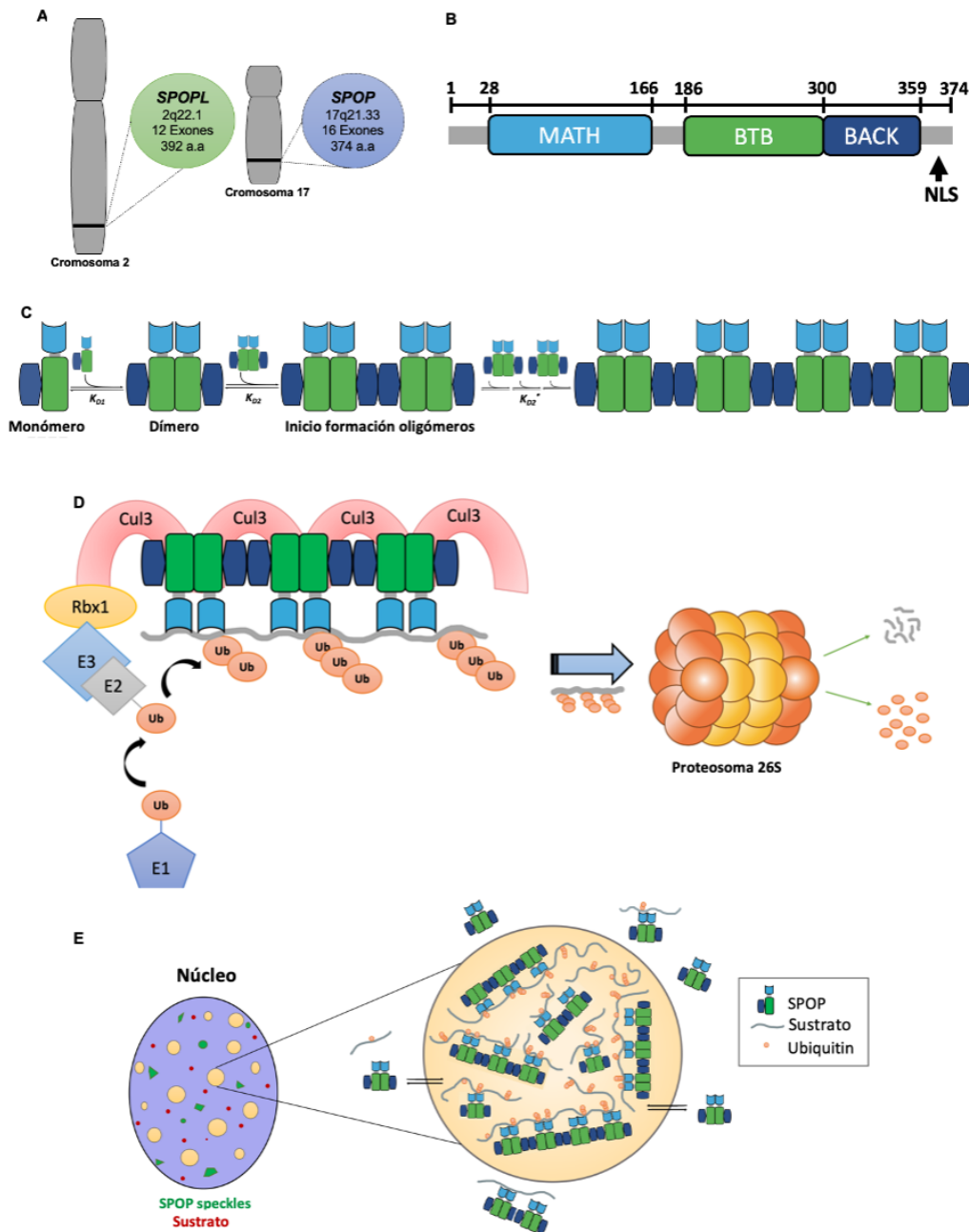


Figura 8. Estructura y función de la proteína SPOP. **A.** Locus de SPOP y SPOPL. **B.** Dominios de SPOP: MATH (azul claro), BTB (verde), BACK (azul oscuro) y secuencia de localización nuclear (NLS) **C.** Asociación dimérica y oligomérica de SPOP. **D.** Complejo Ubiquitin ligasa E3 Cul-3 RING-Box1 en el que se aprecia el papel adaptador de un oligómero de SPOP para la ubiquitinación del sustrato (línea ondulada gris) y posterior degradación en el proteosoma 26S. **E.** En el núcleo, SPOP en oligómeros de orden superior se observa como pequeñas motas nucleares verdes, el sustrato disponible para ser ubiquitinado en rojo; el aumento en la concentración del sustrato genera focos de localización SPOP-sustrato que forman orgánulos líquidos sin membrana (amarillo) lo que favorece la oligomerización de SPOP y la localización del sustrato mono o multivalente para su ubiquitinación. Tomado de [135], en prensa.

- Dominio BACK (BTB con repeticiones Kelch)

El dominio BACK consta de dos repeticiones en donde la primera es de tipo 3-box y permite una mayor superficie de interacción entre BTB y Cul3 y la segunda repetición por la cual se da la interacción con otros dominios BACK de SPOP. Seguido del dominio BACK, en los residuos 360-374 a.a de la región c-terminal se encuentra la NLS con una estructura α -helicoidal que permite su localización en el núcleo [128]. Se ha evidenciado que la formación de oligómeros lineales de alto peso (>500kDa) de SPOP se da por medio de interacciones entre los dominios BACK, el reclutamiento de sustratos multivalentes mediado por SPOP para ubiquitinación y posterior degradación aumenta significativamente en cuanto más oligómeros se forman (Figura 8D), indicando la importancia de la formación de estos conjuntos en la función del complejo [127,136].

La interacción entre los oligómeros de SPOP y sustratos genera orgánulos líquidos sin membrana resultantes de la separación de fases líquido-líquido (LLPS), como motas nucleares (Figura 8E) [30,137]. La creación de estos complejos es dependiente de la concentración de SPOPL, ya que la isoforma carece de 18 residuos en el dominio BACK, lo que resulta en la imposibilidad para formar oligómeros, sugiriendo a SPOPL como un regulador en el proceso de ubiquitinación [138]. La formación de estas LLPS potencian la unión de enzimas y sustratos regulando parte de la actividad celular, pero las mutaciones asociadas a los dominios en las diferentes proteínas pueden desestabilizar los complejos e interrumpir su co-localización, esto sugiere que los orgánulos que se crean podrían estar involucrados en procesos de homeostasis celular como ubicación, función, control y equilibrio de diferentes proteínas [136].

- **Funciones de SPOP**

Aproximadamente un 20% de la degradación de proteínas en la célula está mediada por complejos CRL-RING de Ubiquitin ligasas E3, específicamente Cul3 utiliza adaptadores propios de sustratos como SPOP [139]. En el complejo Ubiquitin ligasa E3 Cul3-RING-Box1, SPOP mediante su dominio BTB se une a Cul3, este interactúa con Rbx1 y este con E3 que a su vez se une a E2, encargada de ubiquitinar el sustrato, que ha sido reclutado por el dominio MATH de SPOP. Una vez el sustrato es ubiquitinado, es dirigido al proteosoma 26S para su degradación (Figura 8D). Teniendo en cuenta el papel de SPOP

en la ubiquitinación y degradación de sustratos, la proteína adaptadora está relacionada directamente con la regulación en la cantidad de estas proteínas [140]. En cáncer de próstata se han descrito más de 24 sustratos de SPOP, cuyas funciones varían e involucran regulación de la transcripción, del ciclo celular y apoptosis, regulación hormonal, supresión del sistema inmune, regulación epigenética, remodelación de la cromatina y otros (Tabla 2) [6,26,136,141–149,31,150–159,45,160–169,49,170,74,128,129,132,134].

Tabla 2. Sustratos de SPOP en CaP clasificados por función.

Función	Sustrato	Referencia
Receptor de hormonas esteroideas	Receptor de Andrógenos (RA)	[24,45]
Regulación de la transcripción	Motivo tripartito 24 (TRIM24)	[156,157]
	Coactivador del receptor de esteroides 3 (SRC3)	[171,172]
	Factor de transcripción ETS (ERG)	[118,161]
	Factor de transcripción activador 2 (ATF2)	[141]
	Factor 1 asociado a CTD relacionado con SR (SCAF1)	[144]
	Proto-oncogen c-MYC	[173]
	Factor de transcripción homeobox NANOG	[143,145,155,174]
	Proteínas de la vía Hedgehog: familia de oncogenes asociados con glioma Gli2/Gli3	[146,162,175]
Regulación del ciclo celular	Proteína del ciclo de división celular 20 (Cdc20)	[132]
	Ciclina E1	[164]
	Proteína 1 asociada al ciclo celular (CAPRIN1)	[144], [165]
Regulación del ciclo celular, de la transcripción y apoptosis	Proteína asociada al dominio de muerte (DAXX)	[148], [151], [137]
Regulación epigenética/ Remodelación de la cromatina y regulación de la transcripción	Proto-oncogen DEK	[49]
	Motivos de dedos de zinc ampliamente espaciados WIZ	[144]
	Proteínas de la familia de bromodominio y dominio extraterminal (BET: BRD2/3/4)	[147,159]
Supresión sistema inmune	Ligando 1 de muerte programada (PDL1)	[31]
Eliminación de SUMO	Sentrin proteasa específica 7 (SEN7)	[176,177]
Regulación de la polimerización de actina, mantenimiento de la estructura Golgi y fisión mitocondrial	Dominio formina invertida (INF2)	[150]

Se ha propuesto que SPOP también modula actividades de represión transcripcional y que participa en la reparación de rupturas de ADN de doble cadena (DSB) [44], donde es reclutada formando focos nucleares que dependen de la actividad de la quinasa mutada en ataxia-telangiectasia (ATM) y se colocan con focos de la histona γ -H2AX de

respuesta al daño. Se ha demostrado que la depleción o disminución de SPOP genera una respuesta al daño del ADN (DDR) deteriorada y una alta sensibilidad a la radiación ionizante, sin embargo, el mecanismo aún no está determinado, pero podría estar asociado a la regulación que ejerce sobre los niveles de expresión de los factores Rad51 y Ku80 que son importantes en DSB por recombinación homóloga (HR) [178,179]. Adicionalmente se observó mediante un análisis de interactoma, que SPOP se asocia con múltiples proteínas involucradas en la transcripción, empalme y exportación de ARNm [180].

- **SPOP como gen supresor tumoral**

En CaP se han encontrado mutaciones de cambio de sentido con pérdida de función en el dominio MATH de SPOP (Figura 9A), los puntos de mutación más frecuentes se localizan en la hendidura de unión a sustrato (Figura 9B). Estas mutaciones no permiten que el sustrato se una al dominio MATH y por lo tanto, no pueden ser degradados [20], [27], [33], [34], [169], [170]. En este caso SPOP actúa como un gen supresor tumoral a diferencia de otros tipos de cáncer como de riñón en donde puede actuar como oncogén, al estar altamente expresado degradando proteínas como PTEN, DUSP6, DUSP7, DAXX, Gli2 y LATS1 o aumentando la expresión de β -catenina a nivel postranscripcional y del Factor de transcripción 4 (TCF4), los cuales regulan positivamente al factor de transcripción ZEB1, inductor de la transición epitelio mesenquima (EMT) [128,183–186].

Las mutaciones impiden que SPOP pueda unirse a su respectivo sustrato, es decir son de pérdida de función, aumentando la cantidad del sustrato, estos sustratos en muchos casos son proteínas que hacen parte de vías de señalización, que al desregularse desencadenan procesos de progresión tumoral. El aumento de la cantidad de sustratos como el receptor de andrógenos (AR) en CaP, favorece la transcripción de proteínas como el antígeno prostático específico (PSA) y otras, involucradas en proliferación y supervivencia [74,136].

Otro sustrato de SPOP encontrado en CaP es el coactivador del receptor de esteroides (SRC3) que se sobreexpresa en estos tumores. El aumento de este sustrato en CaP se ha asociado con el incremento en la transcripción del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), que a su vez activa las vías de señalización PI3K/mTOR y AKT implicados en procesos de crecimiento y proliferación celular [45,74,133,172]. Las proteínas de la familia

de bromodominio y dominio extraterminal BET como BDR2, BDR3 y BDR4 también se han relacionado a CaP. Estas proteínas aumentan su estabilidad por mutaciones en algunos residuos de SPOP [187].

En CaP se ha encontrado una mutación germinal en el dominio BTB (N296I) asociada con CaP hereditario en una familia con ascendencia europea [188], pero el resto de las mutaciones halladas son somáticas (Figura 9), con una frecuencia que varía según la malignidad del tumor y la población. En CaP localizado, la frecuencia está entre 5-20% y en el avanzado entre 15-25%. En cuanto a la población, en ancestría africana se ha presentado con una frecuencia de 20%, mientras que en ancestría europea entre 6-10%, en población asiática entre 7-12% y en norteamericanos entre 5-14% [6,16–18,48,189,190].

En CaP también existen otros cambios genéticos relacionados a *SPOP* mutado como las deleciones somáticas en 5q21 y 6q21, regiones que contienen genes que pueden estar implicados en la progresión de la enfermedad [44,191]. El locus 5q21 contiene el gen *CHD1*, que codifica para la helicasa con cromodominio de unión a ADN, implicada en la regulación de la transcripción génica mediante la interacción y remodelación de la cromatina [6], y en la estabilidad genómica, ya que su pérdida disminuye la reparación por recombinación homóloga (HR), favoreciendo la reparación por recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ) que es propensa a generar errores [192]. Por otra parte, el locus 6q21 contiene el gen forkhead box O3 (*FOXO3*) que actúa como factor de transcripción regulador de genes necesarios para la muerte celular, por lo que su pérdida se ha visto implicada en carcinogénesis y progresión de CaP [6]. Esto podría indicar que los efectos de las mutaciones de SPOP tienen sinergia con las de estos genes u otros que se ubiquen en estas regiones.

La pérdida de función de SPOP también afecta la reparación del ADN [180]. En CaP, se ha encontrado una alta inestabilidad genómica, relacionada con una deficiencia en la HR, una disminución en el reclutamiento de RAD51 y un aumento en la NHEJ [45], [166]. La disminución en la expresión de SPOP también conduce a estrés de replicación espontánea y desregulación del ciclo celular [180].

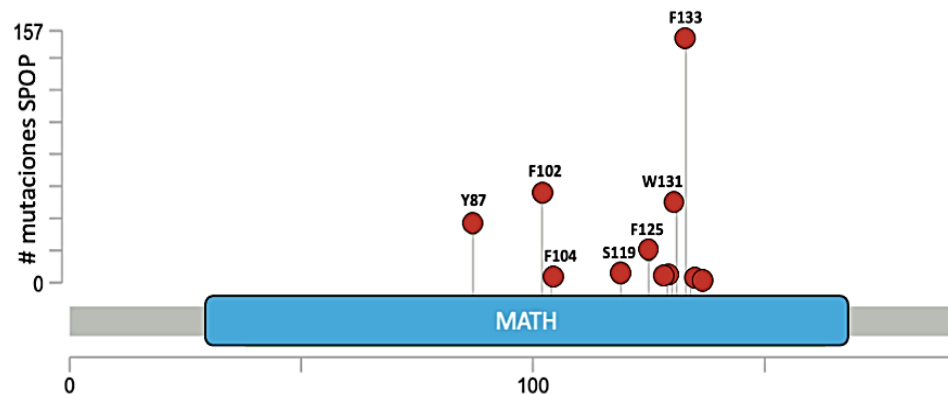
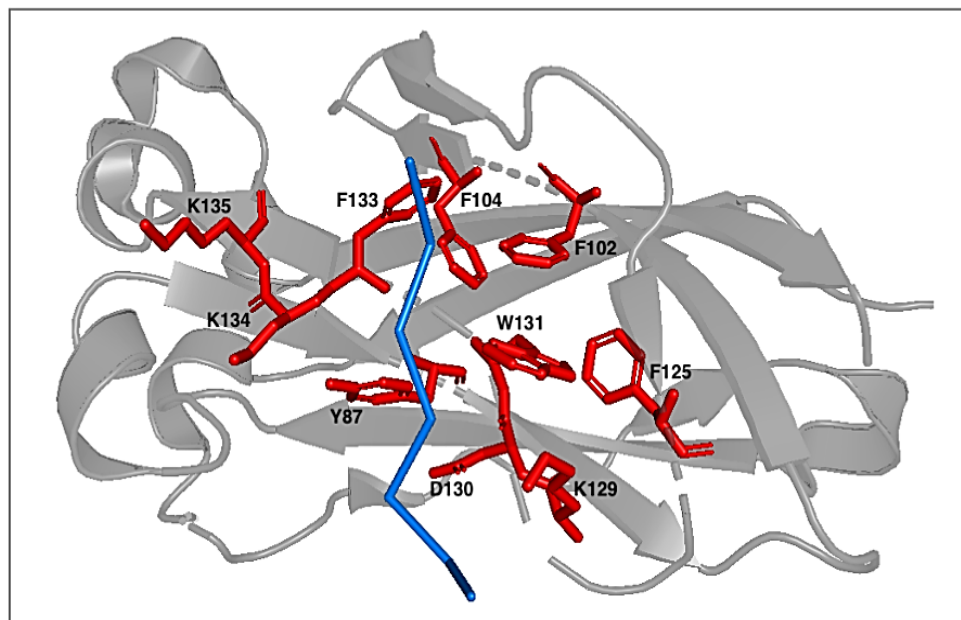
A Frecuencia de mutación: localizado 5-20%, avanzado 15-25%**B**

Figura 9. Mutaciones puntuales del dominio MATH en SPOP en cáncer de próstata. A. Frecuencia de las mutaciones, puntos calientes de mutación y número de mutaciones reportadas en cáncer de próstata con impacto clínico en la enfermedad. **B.** Estructura cristalina del dominio MATH con mutaciones puntuales con cambio de sentido relevantes en cáncer de próstata. Los residuos están señalados con color rojo, en color azul se encuentra parte del motivo de unión de sustrato (BDR3) (PDB-6I41) Tomado de [135], en prensa.

Un análisis de interactoma de SPOP^{wt} demostró que la proteína adaptadora se asocia con factores involucrados en la transcripción de ARN polimerasa II, empalme de ARNm y exportación nuclear, estos hallazgos sugieren que SPOP podría cumplir un papel en la regulación de la transcripción de genes de reparación y replicación. Teniendo en cuenta lo anterior, se encontró que en CaP el mutante F133V genera deficiencia en la expresión de

BRCA2, ATR, CHK1 y RAD51, no obstante, los mecanismos de regulación de estas proteínas mediante SPOP aún no están claros [180,193].

Por otro lado, el mutante F133V en células con RA positivo también se ha asociado con una disminución en los niveles de las fosfodiesterasas TDP1-TDP2 y de la endonucleasa MRE11, que son enzimas esenciales para completar el proceso de reparación de ADN al liberar la Topoisomerasa 2A (TOP2A) del complejo de escisión, lo que involucra a la proteína adaptadora en la reparación de ADN por enlaces cruzados [194].

La regulación en el aumento de sustratos de SPOP a nivel celular puede darse mediante la pérdida de función por mutaciones pero también podría derivarse de la regulación en su expresión, se ha encontrado en células de CaP dependiente o independiente de andrógenos, que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) activa SMAD2/3 y este a su vez se une al promotor de SPOP, generando una inhibición en la transcripción de la proteína [195].

- **Utilidad de SPOP como biomarcador pronóstico**

En CaP su papel como biomarcador de pronóstico es controversial, algunos estudios revelan que pacientes con *SPOP* mutado o con baja expresión de la proteína presentan un tiempo menor de supervivencia libre de progresión bioquímica y clínica comparados con pacientes sin la mutación [25], [77], [98], sin embargo, en otros estudios *SPOP* mutado se ha asociado con un pronóstico favorable, encontrándose una menor frecuencia de márgenes positivos, extensión extraprostática e invasión de vesículas seminales en la prostatectomía radical, además de una mayor supervivencia libre de metástasis, particularmente en pacientes PSA preoperatorio alto [25,37]. En otros tipos de cáncer como cáncer gástrico, cáncer de riñón o colorrectal, si se ha evidenciado una asociación entre SPOP y pronóstico [182]–[188].

- **SPOP como posible objetivo terapéutico**

En los últimos años, ha estado en curso el uso de pequeñas moléculas heterobifuncionales denominadas Quimeras dirigidas a proteólisis (PROTAC, por sus siglas en inglés) que puedan favorecer pacientes con sustratos sobreexpresados como el AR o proteínas BET. La estructura de estas moléculas proviene de medicamentos previamente utilizados como los antiandrógenos bicalutamida o enzalutamida o inhibidores de proteínas BET como JQ1, pero buscan mejorar la especificidad al sustrato y romper la barrera de resistencia que se genera. Estos avances son importantes, ya que en CaP se genera resistencia a estos inhibidores, por lo cual, se ha diseñado la quimera ARV-771, que muestra gran eficacia contra BRD4 y suprime tanto los niveles de AR como su señalización conduciendo a regresión tumoral o NEO2734 que se propone como un nuevo inhibidor BET, a pesar de ello, esto aún está en fase de estudio para determinar la eficacia anticancerígena sobre los pacientes [153,154,198–200] (Figura 10A).

Por otro lado, el caso de pacientes que presentan una activación aberrante de las vías AKT/mTOR y AR en CaP, recientemente se encontró que la inhibición de la histona deacetilasa 3 (HDAC3) puede dirigirse a estas vías, disminuyendo su activación y suprimiendo el crecimiento tumoral en organoides de pacientes con estas características [27] (Figura 10B).

Por otra parte, podrían generarse efectos sobre la reparación en el ADN. Se han realizado ensayos con inhibidores de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) en modelos animales con CaP, con el fin de bloquear la reparación en las células tumorales, llevándolas a la muerte, por lo que los pacientes podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores PARP u otras terapias que afecten la reparación de ADN; esto podría sugerirse para adenocarcinoma de pulmón en donde la reparación también se ha visto afectada con mutaciones en *SPOP* (Figura 10C) [44].

Estudios recientes han mostrado que pacientes con *SPOP* mutado en CaP generan resistencia a docetaxel debido al aumento en la expresión del sustrato CAPRN1 que favorece la formación de gránulos de estrés dando paso a la supervivencia de células tumorales, lo que sugiere que intervenir la formación de estos gránulos mediante la restauración de la degradación de CAPRN1 podría funcionar como mecanismo para restaurar la sensibilidad al medicamento, lo cual podría beneficiar a pacientes resistentes

a esta quimioterapia [165]. Otro estudio reveló que pacientes con CaP metastásico resistente a la castración (mCRCP) con mutaciones *SPOP* y/o deleciones *CHD1* presentan una mayor tasa de respuesta a tratamiento con abiraterona, un inhibidor de la síntesis de andrógenos, en comparación con casos que carecen de estas alteraciones, sin embargo, se requieren ensayos clínicos prospectivos para validar esta respuesta al tratamiento [190].

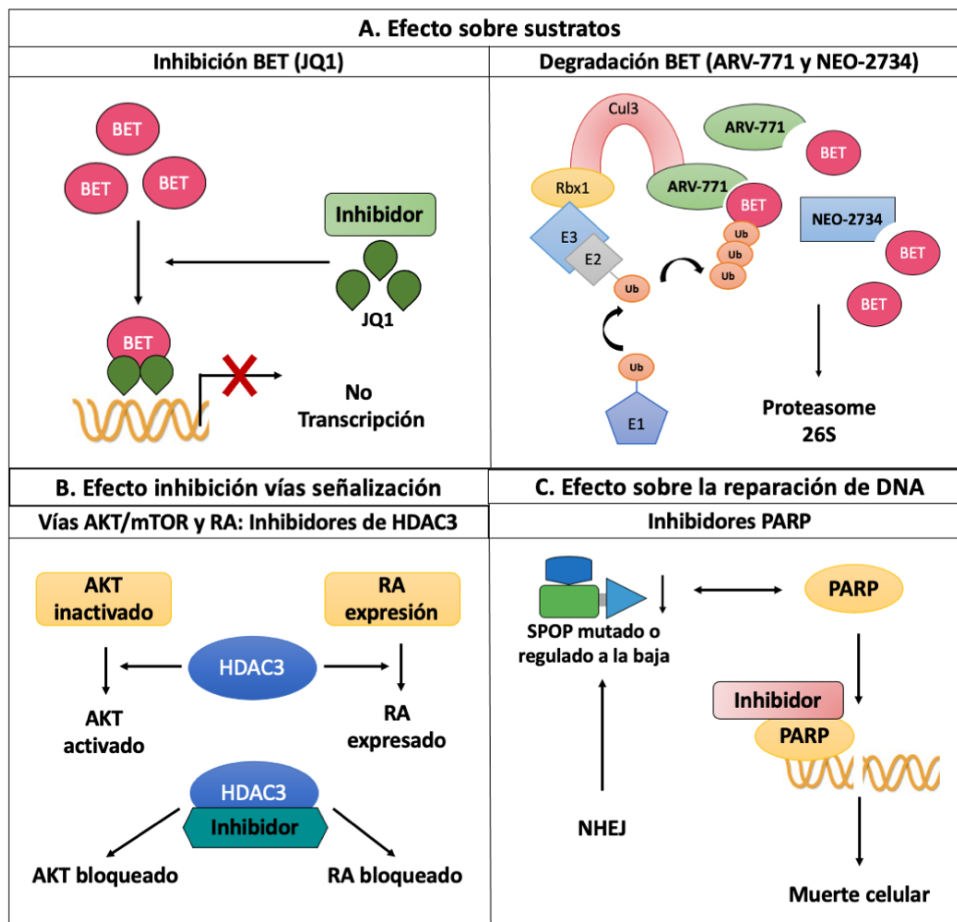


Figura 10. Posibles intervenciones terapéuticas en tumores con alteraciones de *SPOP*, según mecanismos de acción. **A.** Efecto sobre sustratos de *SPOP*: Inhibidores de su función (JQ1 inhibe las proteínas BET) o moléculas que favorecen su degradación (PROTAC ARV-771 y NEO-2734 favorecen la degradación de BET). **B.** Inhibición de las vías de señalización activadas por la alteración en *SPOP* como las vías AKT/mTOR y RA inactivadas mediante el uso de inhibidores de HDAC3. **C.** Debido al efecto de *SPOP* sobre el daño del ADN, se pueden usar inhibidores de PARP, generando efectos sobre la reparación del ADN, induciendo la muerte celular. Tomado de [135], en prensa.

- **Mutaciones en *FOXA1***

- **Estructura y función de *FOXA1***

La proteína forkhead box-A1 es un factor de transcripción identificado inicialmente como el factor nuclear de hepatocitos 3 y fundador de la familia FOX de factores de transcripción [201,202]. Está codificado por el gen *FOXA1*, el cual se localiza en 14q21.1 con un total de 5698 pb y 3 exones. La proteína está conformada por 472 a.a, con un peso de 49,15 KDa (Figura 11A) [201]. Este factor de transcripción posee un dominio forkhead de unión al ADN en una configuración de hélice-bucle-hélice, dos dominios de transactivación ubicados en la secuencia N y C terminal y secuencias de localización nuclear. El dominio forkhead está comprendido por tres α -hélices (H1-H2-H3), tres láminas- β (L1-L2-L3) y dos loops principales (W1 y W2). Entre H1 y H2 hay una cadena que interactúa con L1 antiparalela. Un loop conecta H2 y H3 y corre a lo largo de la estructura de la proteína, también esta conformado por un loop denominado wing 1 (W1), que interactúa con grupos fosfato de moléculas de ADN cercanas y se encuentra entre L2 y L3. Hacia el extremo C terminal de la cadena se extiende otro loop largo conocido como wing 2 (W2) que tiene un importante contacto con motivos de unión a ADN junto con W1. (Figura 11B) [42,203].

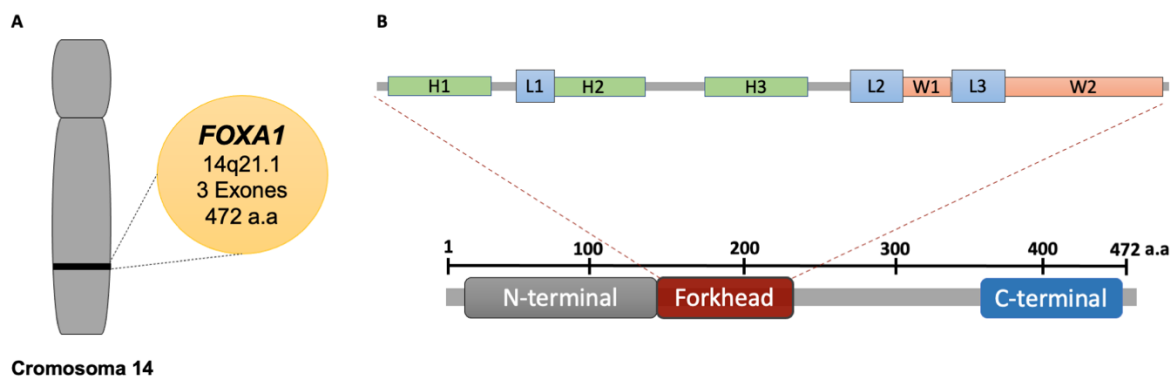


Figura 11. Estructura de la proteína FOXA1. A. Locus de *FOXA1*. **B.** Dominios de FOXA1: Dos dominios de transactivación N y C terminal (gris y azul, respectivamente) y un dominio Forkhead (rojo), con estructura de tres hélices α (H1-H2-H3), tres láminas β (L1-L2-L3) y dos loops (W1 y W2).

Entre sus funciones principales, FOXA1 es esencial para el desarrollo normal de varios tejidos y su metabolismo, entre ellos la próstata. Se describe como un factor pionero ya que es capaz de activar y facilitar la transcripción de múltiples genes, al interactuar con la

cromatina, abrirla y permitir el acceso de estas regiones a otros factores, entre ellos receptores nucleares, como el receptor de andrógenos (RA) o el receptor de estrógenos (RE) [41,204,205]. Algunos estudios indican que *FOXA1* no es esencial para la expresión del RA pero se sugiere que es requerido para la función del RA en la próstata en desarrollo. Al interactuar directamente con este receptor, *FOXA1* regula los programas transcripcionales de relevancia en el tejido prostático tanto normal como en lesiones neoplásicas [202].

FOXA1 es capaz de unirse al ADN y de reclutar ciertas proteínas para iniciar el proceso transcripcional. Este proceso de interacción entre proteínas es facilitado por la pérdida de metilación del ADN y la presencia de histonas metiladas, específicamente modificaciones en H3K4me1 y H3K4me2 [206], se ha asociado recientemente que estos mecanismos de regulación a la interacción de este factor de transcripción con la desmetilasa LSD1 [207]. Adicionalmente, se ha observado que *FOXA1* participa en la regulación de la apoptosis al inhibir la expresión de BCL2 [202].

- **Papel de *FOXA1* en cáncer de próstata**

FOXA1 juega un papel crítico en el desarrollo del CaP, dada su interacción con el RA, se ha evidenciado que además de activar la transcripción, también es capaz de reprogramar el citoma de RA en un nuevo conjunto de sitios de unión impulsando la transformación de células epiteliales normales, esto junto con el factor de transcripción HOXB13 [205,206,208]. Por otro lado, se ha reconocido como supresor de la diferenciación neuroendocrina encontrando que la pérdida de expresión de *FOXA1* puede promover la progresión de cáncer de próstata neuroendocrino [209,210].

La pérdida de *FOXA1* se ha relacionado con hiperproliferación epitelial, disminución de la expresión del gen homeobox supresor de tumores NKX3.1 y aumento de los niveles de SHH, que contribuye fuertemente en la carcinogénesis prostática [42,204,211]. Adicionalmente, el silenciamiento da como resultado una alteración en la unión al RA y la expresión génica [6,212,213]. Esto sugiere que este factor de transcripción puede actuar como un gen supresor tumoral, sin embargo, se ha observado que sobreexpresión o mutaciones específicas, pueden aumentar la función de la proteína en procesos de

transcripción e interacción con la cromatina, desencadenando progresión tumoral, lo que indicaría que también puede actuar como oncogén dependiendo de las proteínas con las que interactúe, el estadio de la enfermedad e incluso el tipo de tejido afectado [6,33,214].

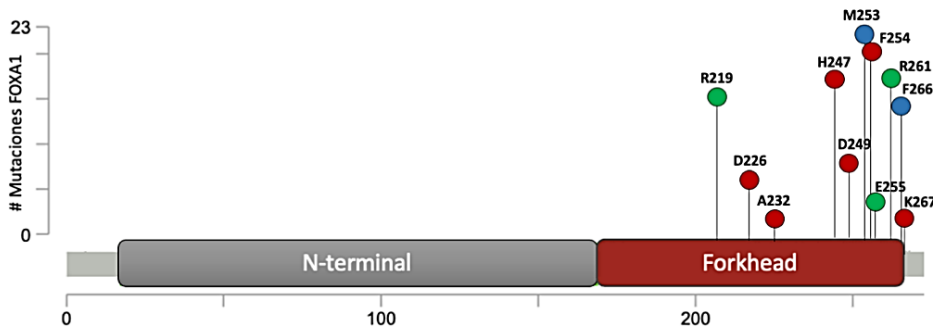
Se han encontrado alteraciones moleculares en *FOXA1* como mutaciones en el dominio Forkhead, afectando la interacción con el ADN. La frecuencia varía dependiendo de la etapa de la enfermedad y el tipo de población. En población occidental en CaP localizado el porcentaje oscila entre el 3-9% mientras que en CaP avanzado varía entre el 10-13%, por otro lado uno de los últimos análisis realizados en población asiática se encontraron mutaciones en el 41% de la población china (Figura 12), estos estudios muestran la importancia del análisis de las alteraciones moleculares en diferentes poblaciones dadas las diferencias que se pueden encontrar además del impacto a nivel de blancos terapéuticos a desarrollar [6,17,98,205,206,215].

Los residuos de *FOXA1* frecuentemente mutados y con implicaciones oncogénicas son M253, F254, H247, R219, D226, R261, D249, A232 y K267 (Figura 12) [181,182]. En un estudio realizado mediante análisis bioinformáticos, se encontraron alteraciones moleculares de *FOXA1* agrupadas en tres clases, dependiendo de otros factores, en la clase 1 se agrupan los CaP temprano sin alteraciones ETS o SPOP, se repite selectivamente en la región wing 2 del dominio forkhead, permiten una mayor movilidad de la cromatina y transactivan fuertemente los RA; por otra parte, las mutaciones de activación de clase 2 son generadas en CaP metastásico, truncan el dominio C-terminal, aumentan la unión a la cromatina al potenciar la afinidad de unión al ADN y regulan la progresión EMT debido a la inactivación de TLE3 que a su vez suprime WNT; y finalmente la clase 3, que hace referencia a reordenamientos genómicos que consisten en duplicaciones y translocaciones y reposicionan elementos reguladores para impulsar sobreexpresión de *FOXA1*, esta se da en CaP metastásico [98,216].

Las mutaciones puntuales con cambio de sentido del dominio Forkhead pueden ocasionar cambios en la afinidad de unión al ADN como se mencionó anteriormente, afectando su función a nivel celular. Las mutaciones M253K o F266S pueden reducir la afinidad de unión al ADN, ocasionando pérdida de función de la proteína y disminuyendo su expresión [214], mientras que de manera diferente mutaciones como R261G muestran una afinidad mayor conduciendo a una activación transcripcional potenciada [216]. También se ha observado

que mutaciones como R219S o E255 mejoran la actividad de interacción de FOXA1 con la cromatina induciendo sitios de unión más accesibles y nuevas regiones de empalme [43]. Otras mutaciones como D225G y M253K generaron afinidad a nuevos motivos de unión no canónicos, ampliando el panorama de actividad del factor de transcripción con otras proteínas [215].

A Frecuencia de mutación: localizado 3-41%



B

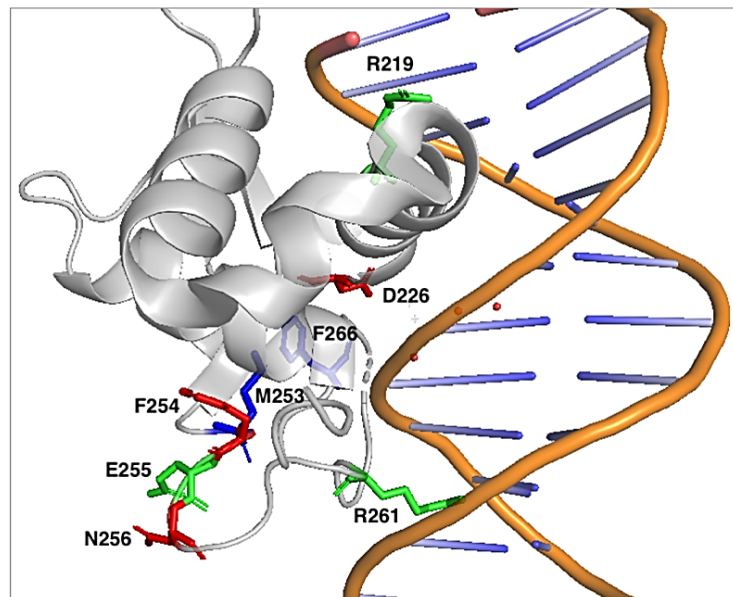


Figura 12. Mutaciones puntuales recurrentes en el dominio Forkhead de FOXA1. A. Frecuencia de las mutaciones, puntos calientes de mutación y número de mutaciones reportadas con relevancia clínica en cáncer de próstata **B.** Estructura cristalina del dominio Forkhead con algunas de las mutaciones por cambio de sentido más frecuentes. Los residuos señalados están en color rojo y se muestra parte de la hebra de ADN (PDB-1VTN), los residuos con mutaciones que reducen afinidad de unión al ADN se muestran en azul y los residuos con mutaciones que mejoran actividad en verde.

Dado su papel en la regulación del RA se han generado hallazgos diversos entre la actividad de FOXA1 mutado y el receptor nuclear. Por un lado, se ha determinado que las mutaciones generan una activación transcripcional de la proteína y una formación luminal-RA positiva elevada [17,215], pero de otra manera, otros estudios asociaron las mutaciones de *FOXA1* con una regulación a la baja en la señalización del RA, estos estudios sugieren que la actividad promotora o supresora pueden depender del tipo de mutación y del estadio de la enfermedad [214,215].

- ***FOXA1* como posible biomarcador de pronóstico**

Algunos estudios han propuesto que la expresión de FOXA1 mediada por las distintas mutaciones está asociada con la progresión tumoral y con un peor pronóstico en CaP, se ha demostrado que esto puede ser o no dependiente de la cooperación funcional con el RA, lo cual está determinado por el ambiente tumoral, la etapa de la enfermedad y la historia del tratamiento [41,217]. Jin y colaboradores informaron que FOXA1 promueve la proliferación en CaP al inducir la expresión de genes en el ciclo celular, por medio de la señalización del RA en presencia de andrógenos [212]. También se ha encontrado que la deficiencia de *FOXA1* lleva a la alteración en la diferenciación y maduración de las células epiteliales lumbales, lo que dirige a la progresión de la enfermedad [213]. Análisis realizados con muestras de tejido humano han revelado que FOXA1 se sobreexpresa en pacientes con cáncer metastásico y en CPRC, mientras que su expresión es mucho menor en la zona de transición normal y neoplásica [41,212]. Por otro lado, los niveles de expresión de FOXA1 han sido correlacionados significativamente con parámetros clínico-patológicos como PSA, puntaje de Gleason, la etapa tumoral y tiempos de supervivencia libre de recaída, sugiriendo que niveles elevados de FOXA1 se asocian con un mal pronóstico [33,41].

En un estudio, fueron encontradas mutaciones en *FOXA1* como delección de L388 y mutación puntual R261H asociada a ganancia de función, además alteraciones en *SPOP* como mutaciones F133L o baja expresión que se asociaron a GG5 y estas alteraciones junto con otras como inserciones/delecciones de H247-R261, F254-G257, M253-R261, mutaciones en N216S y R262C de FOXA1 (14/98), se asociaron a un tiempo menor hasta la recurrencia bioquímica, lo que podría sugerir una relación con mal pronóstico de la

enfermedad [32]. Adicionalmente, estudios recientes, muestran que podrían relacionarse las diferentes alteraciones moleculares generadas en *FOXA1* como mutaciones, dependiendo de la clase, con la progresión y pronóstico de la enfermedad, según lo mencionado previamente, y que esto además funcionaría como un seguimiento a la evolución o respuesta de la enfermedad ante tratamientos [43,216]. La inhibición directa de *FOXA1* es difícil dada su localización nuclear y sus mecanismos de acción, por lo que se han encaminado los esfuerzos para inhibir proteínas de diferentes vías como *CDK1*, o *LSD1*, teniendo en cuenta la fuerte asociación entre la actividad de *FOXA1* y estas proteínas [207,218].

Teniendo en cuenta lo anterior y dado que la frecuencia y el tipo de alteraciones no solo varía de acuerdo con el estadio de la enfermedad, sino que también depende de la población, como lo indican análisis como el de CPGA de población china que obtuvo resultados diferentes a comparación del estudio del TCGA (41% vs 3%) (Figura 5). Teniendo en cuenta todo lo anterior, se sugiere que *FOXA1* puede actuar como un biomarcador pronóstico, pero es necesario realizar más estudios que relacionen la etnicidad o ancestría con respecto a las alteraciones de este factor de transcripción para proponer asociaciones a pronóstico más precisas y opciones de tratamiento adecuados [6,17,32,42,98,207].

- **Mutaciones en *IDH1***

- **Estructura y función**

Isocitrato deshidrogenasa 1 es una enzima oxidoreductasa, codificada por el gen *IDH1*, el cual se localiza en 2q34 con un total de 18845 pb y 12 exones. La proteína está conformada por 414 a.a, con un peso de 46,7 KDa (Figura 13A) [219,220]. A nivel estructural, se clasifica como una enzima de tipo α/β que puede formar dímeros o tetrámeros. La formación de tetrámeros permite la condición funcional de la enzima formando surcos de naturaleza hidrofílica. Está conformada por tres dominios principales, un dominio grande el cual comprende los residuos 1-103 y 286-414 a.a y se conforma de por láminas β paralelas unidas por dos α hélices, un dominio pequeño que va de 104-136 y 186-285 a.a

con una conformación estructural α/β en forma de sandwich y un dominio de cierre que varía de 137 a 185 a.a y de pliega como dos hojas β antiparalelas de dos hebras (Figura 13B). IDH1 contiene una secuencia de localización peroxisomal C-terminal y se encuentra en peroxisomas y citosol [220].

Una hoja β une los dominios grande y pequeño formando dos hendiduras, una de ellas es de naturaleza hidrofílica y conforma el sitio activo, permitiendo la unión de NADP y iones metálicos. La otra hendidura es de carácter hidrofóbico en su base e hidrofílico al borde y se sugiere que podría estar involucrada en la regulación conformacional de la enzima. El dominio de cierre permite la estabilidad de la estructura dimérica de NADP-IDH1, manteniendo juntas las dos subunidades para la formación del sitio catalítico activo [220].

El isocitrato forma interacciones hidrofílicas con los residuos R100, R109, R132, Y139, K212 y D275, adicionalmente forma enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de T77 y S94. Se han encontrado mutaciones puntuales en algunos de estos residuos en diferentes tumores, pero con mayor frecuencia gliomas o leucemias (Figura 13C) [220–222]. Esta enzima se encarga de catalizar la descarboxilación oxidativa de isocitrato en presencia de NADP produciendo α -cetoglutarato (α -KG) y NADPH (Figura 14). Esta conversión se considera un proceso irreversible en el metabolismo central [34].

Estas mutaciones generan que la enzima no pueda catalizar de forma eficaz la descarboxilación oxidativa del isocitrato, y en su lugar convierta este producto al oncometabolito D2-hidroxioglutarato (D2HG). Estructuralmente α -KG y D2HG son similares, por lo que se genera una inhibición competitiva, produciendo grandes cantidades de D2HG, mientras que disminuyen los niveles de α -KG y por lo tanto se inhibe la actividad de enzimas como dioxigenasas o histonas demetilinas que son dependientes de este metabolito [34,35,221].

El aumento considerable de D2HG también incrementa el estrés oxidativo celular, genera cambios en la metilación de ADN y desregulación de algunas vías de señalización relacionadas con progresión tumoral como la estabilización de HIF1- α . Estas alteraciones pueden desencadenar variaciones en angiogénesis, en el estado epigenético, en la

dinámica de la matriz extracelular, en proliferación y supervivencia a nivel celular, brindando al tumor la capacidad de progresar (Figura 14) [223,224].

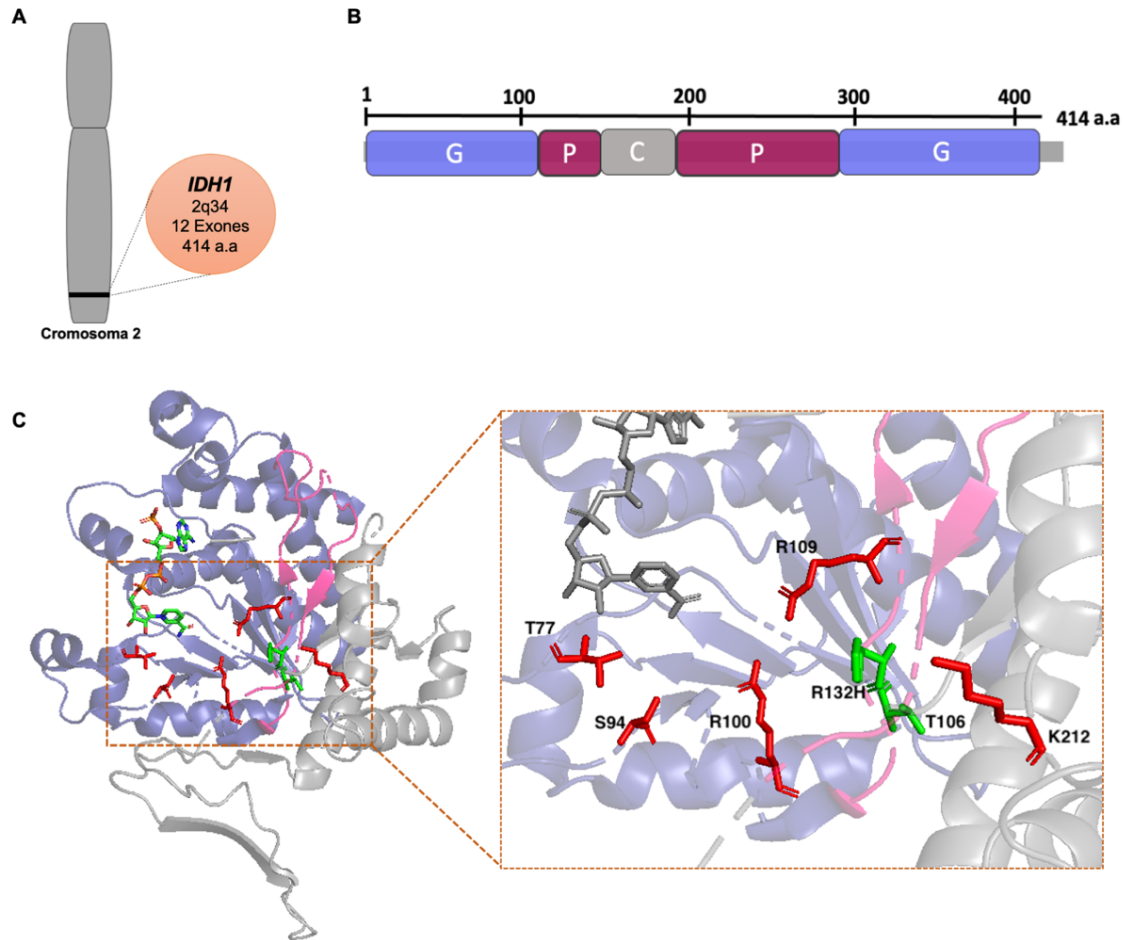


Figura 13. Estructura y puntos de mutación de la proteína IDH1. **A.** Locus de *IDH1*. **B.** Dominios de IDH1: Tres dominios principales, un dominio grande (G), un dominio pequeño (P) y un dominio de cierre (C). **C.** Estructura cristalina de IDH1 unido a NADP, con residuos que conforman el sitio activo (color rojo) y con residuos con mutaciones puntuales con cambio de sentido más frecuentes (color verde) (PDB-5SUN).

Las mutaciones reportadas se han presentado en el sitio activo de la enzima (V71, G97, R132 y G123) [34,225]. En CaP se han detectado mutaciones en R132 y T106 con una frecuencia de mutación del 1% [17,225,226]. Un estudio realizado en modelos de líneas celulares, resaltó la capacidad de *IDH1* mutado (R132H) en aumentar la invasión celular

mediante el incremento de D2HG [221]. No obstante, hasta el momento no se han encontrado asociaciones a pronóstico o con variables clínico-patológicas en CaP.

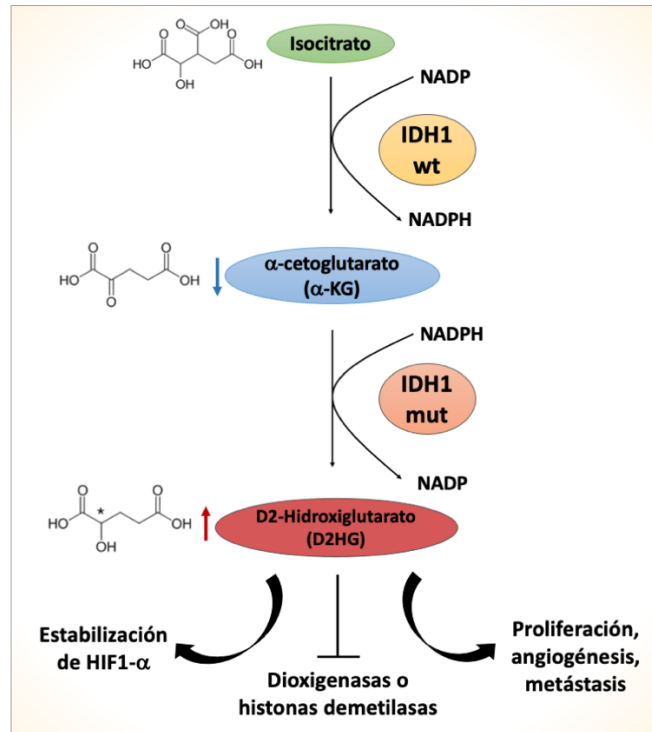


Figura 14. Proceso enzimático de IDH1 de tipo silvestre y mutado. IDH1 de tipo silvestre permite la descarboxilación oxidativa de isocitrato para la producción de α -cetoglutarato (α -KG) mediante NAP. Cuando *IDH1* se encuentra mutado, desestabiliza el proceso mediante la producción de D2-Hidroxiglutarato (D2HG), el cual, al aumentar sus niveles puede desencadenar procesos de progresión tumoral mediante diferentes mecanismos.

5. Metodología

5.1 Diseño del estudio

Estudio descriptivo retrospectivo de muestras de prostatectomía radical de 112 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata (CaP). El número de pacientes fue calculado como se observa a continuación teniendo en cuenta el número de casos diagnosticados con cáncer de próstata por año y tomando la menor frecuencia reportada hasta la fecha de pacientes con mutaciones del gen con mayor frecuencia.

El tamaño de muestra fue calculado teniendo en cuenta la ecuación:

$$n = \frac{NZ^2 pq}{d^2 (N - 1) + Z^2 pq}$$

Donde,

N= Número de casos diagnosticados con cáncer de próstata por año en Colombia.

Z= Coeficiente del nivel de confianza.

p= Proporción estimada de la población.

q= 1 – p

d= Error máximo permisible.

Con nivel de confianza 95% correspondiente a un valor Z=1,96 y un error de 5%:

$$n = \frac{(9564)(1,96^2)(0,08 * 0,92)}{(0,05^2)(9564 - 1) + (1,96^2)(0,08 * 0,92)} = 112$$

El cálculo se realizó de esta manera ya que no se conoce la frecuencia de las alteraciones moleculares en los genes a analizar en población colombiana con CaP.

5.2 Definición de sujetos de estudio

5.2.1 Muestras incluidas

Se partió de una base de datos de 298 casos muestras de prostatectomía radical de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata (CaP) del protocolo institucional aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones y desarrollado en el Instituto Nacional de Cancerología ESE, “Exploración de potenciales biomarcadores predictores del pronóstico en pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata”. A partir de esta base, se realizó la búsqueda y obtención de todas las láminas y bloques de los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) disponibles en el archivo de cada uno de los casos. Del material revisado 131 casos contaban con tejido suficiente, sin previo uso para los ensayos. Posteriormente, se realizó la revisión y clasificación histopatológica por parte del patólogo dejando un total de 118 pacientes que contaban con disponibilidad de al menos 2 bloques clasificados. Adicionalmente, el patólogo señaló los casos en los que se encontraba HGPIN, sin embargo, debido a que no se contaba con el total del material, ya que estos casos se han empleado en otros estudios, solo se encontró HGPIN en 18 de los casos. Se revisó la historia clínica de estos 118 pacientes, seleccionando los casos cuya información de las variables requeridas para los análisis estuviera completa.

Finalmente, para los análisis del estudio se contó con un total de 112 casos, en los cuales se tomó en cuenta el grado de Gleason primario para cada paciente y los casos que no contaron con suficiente material de este, se tomó el grado de Gleason secundario. En 10 de los casos un mismo bloque tenía grado Gleason primario y secundario y para estos se tomaron los dos focos.

5.2.2 Criterios de inclusión

- Casos con diagnóstico confirmado por histopatología de CaP.
- Disponibilidad de suficientes bloques FFPE.
- Acceso a la información clínica requerida como edad, valor del PSA inicial, estadificación clínica y patológica, puntaje de Gleason, valores de PSA de seguimiento posterior a la prostatectomía radical, dato y fecha de recurrencia

bioquímica en caso de presentar, compromiso de márgenes y ganglios, fecha de la cirugía, fecha del diagnóstico, dato y fecha de fallecimiento en caso de presentar.

5.2.3 Criterios de exclusión

- Mala calidad de los bloques FFPE.
- Mala calidad del ADN extraído.
- Cantidad insuficiente de ADN extraído.

5.3 Procedimientos

5.3.1 Análisis de la fusión TMPRSS2-ERG

Para determinar la presencia o ausencia de la fusión entre TMPRSS2 y ERG se realizó hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés). Para esto se seleccionó un bloque FFPE por cada paciente y se realizó una lámina con corte de 2,5µm. Las muestras se procesaron mediante el KIT Aquarius® Tissue Pretreatment de Cytocell (OGT company, Oxford, Inglaterra) y el KIT TMPRSS2:ERG Deletion/Breakapart FISH Probe de Cytocell (OGT company, Oxford, Inglaterra), realizándose la debida estandarización en la muestras de CaP. Las condiciones empleadas para la realización del FISH fueron las siguientes: Incubar el tejido en la lámina a 60°C por 1 hora, sumergir directamente la lámina en xilol durante 10 minutos a temperatura ambiente, sumergir la lámina durante 2 minutos en etanol al 100%, 70% y posteriormente en agua destilada, sumergir la lámina en buffer de pretratamiento a 90°C durante 1 hora y 30 minutos. Secar la lámina y lavar con agua destilada 2 veces durante 3 minutos, secar la lámina y agregar una gota de pepsina sobre el tejido, colocar cubreobjetos inmediatamente e incubar a 37°C por 30 minutos, después se debe retirar el cubreobjetos y lavar con agua destilada por 3 veces durante 2 minutos, sumergir la lámina en etanol al 70%, 85%, 100% y 100% durante 2 minutos, secar la lámina y adicionar 8-10 µl de sonda dependiendo del tamaño del tejido en el corte, cuidadosamente colocar el cubreobjetos y sellar con pegamento todos los bordes, colocar la lámina en el hibridizador durante 10 minutos a 37°C y luego desnaturalizar la muestra y la sonda a 75°C por 5 minutos, colocar un papel húmedo sobre la lámina para evitar evaporación e incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente, retirar cuidadosamente el cubreobjetos sumergir rápidamente en solución 2XSSC a temperatura ambiente y pasar

inmediatamente a solución 2XSSC y 0,05% de NP40 a 72°C por 3 minutos sin agitar, sumergir la lámina en solución 0,4XSSC (pH7) a temperatura ambiente por 2 minutos sin agitar. Finalmente, secar la lámina, agregar 10ul de DAPI, colocar cubreobjetos, dejar revelar en oscuridad y visualizar en microscopio de fluorescencia. Las sondas utilizadas fueron de tres colores, sondas verdes y rojas que se sitúan a cada lado de *TMPRSS2* (21q22,2-q22,3) y tres sondas de color azul que abarcan la región centromérica de *ERG* (21q22,13) (Figura 15A).

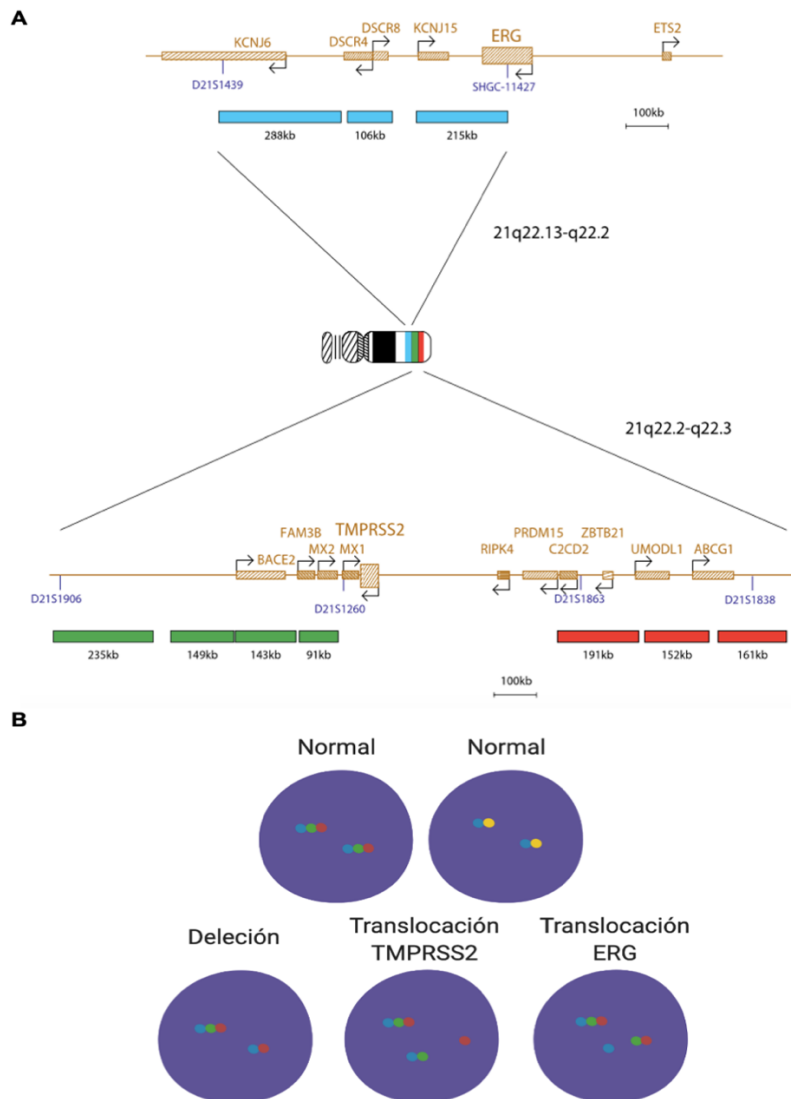


Figura 15. Hibridación de las sondas en *TMPRSS2* y *ERG* y resultados posibles mediante FISH. A. Descripción y Locus de *TMPRSS2* y *ERG* en donde hibridan de las sondas. **B.** Convenciones de resultados posibles en el procedimiento de las muestras FFPE de CaP mediante FISH.

Mediante este kit se determinaron deleciones, translocaciones de Tmprss2 y translocaciones de ERG. La lectura de las láminas de los 112 casos se realizó revisando los núcleos de los focos seleccionados en un microscopio de fluorescencia ZEISS usando objetivos 40X y 100X. La captura de las imágenes se dio con cámara MetaSystems y el programa ISIS.

En una célula normal, debían aparecer dos señales rojo/verde/azul correspondientes a los cromosomas sin alteraciones, o una señal amarilla/azul por el solapamiento entre las sondas, en una translocación de Tmprss2 aparece una señal del cromosoma normal rojo/verde/azul/ y una señal del cromosoma alterado que se divide en una roja y una verde/azul, en una translocación de ERG se produce una señal del cromosoma normal rojo/verde/azul/ y una señal del cromosoma alterado que se divide en una azul y una roja/verde, también pueden generarse deleciones que emite una señal del cromosoma normal rojo/verde/azul/ y una señal del cromosoma alterado roja/azul (Figura 15B). Se realizó la clasificación de los casos en presencia y ausencia de fusión teniendo en cuenta los resultados para realizar los análisis posteriores.

5.3.2 Extracción de ADN

Las muestras negativas para la fusión fueron seleccionadas para los análisis de mutaciones en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*. El ADN de estos casos fue aislado a partir de 1 punch de (2mm) de las muestras que incluyeran al menos un foco con puntaje de Gleason igual o superior a 6. La extracción fue automatizada en el equipo QIAcube QIAGEN, Hilden, Alemania), empleando el kit AllPrep® DNA/RNA FFPE (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante con unas modificaciones. Las modificaciones se realizaron fueron:

- En el proceso de desparafinización, se extendió la incubando a 56°C durante 30 min con 1ml de xilol, en vez de 10s y se efectuaron dos lavados con etanol, en lugar de uno, como lo indica el protocolo.
- En el proceso de incubación a 56°C con la Proteinasa K que fue por 3h y no por 30min como lo sugiere el protocolo.

Se obtuvo un volumen final de 100 μ l. La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante el kit Qubit™ dsDNA HS usando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) obteniendo la concentración por muestra (ng/ μ l). El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

5.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Tomando una muestra de sangre se obtuvo la capa de glóbulos blancos mediante centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos, posteriormente se agregaron 7 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 16000 rpm por 10 minutos, se repite el procedimiento y se desecha el sobrenadante. Se adicionan 10 ml de PBS 1X y se centrifugó a 16000 rpm por 7 minutos, se repite el proceso con 7 ml de PBS y se transfiere el pellet para iniciar con la extracción de ARN, la cual se realizó empleando el protocolo Quick-RNA Miniprep (Zymo research, Irvine, California, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtuvo un volumen final de 40 μ l. La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante el kit Qubit™ RNA HS usando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) obteniendo una concentración de 57 ng/ μ l. El ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit SuperScript First Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), siguiendo el protocolo del fabricante, a partir de 8 μ l de muestra. Se obtuvo 20 μ l de cDNA y fue almacenado a -20°C hasta su uso.

5.3.4 Análisis de mutaciones de *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*

A partir del ADN extraído se realizó la amplificación mediante PCR con Taq de alta fidelidad Platinum™ PCR High Fidelity (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA), según las recomendaciones del fabricante. Se tomaron 4 μ l de ADN de cada muestra FFPE tumoral. Las condiciones de ciclaje fueron incubación a 94°C por 2 minutos, denaturación 94°C por 30 segundos, anillamiento de primers 55°C para *SPOP* y 58°C para *FOXA1* por 30 segundos y extensión a 68°C por 1 minuto, se manejaron 35 ciclos.

Para el caso de *IDH1* se empleó la Taq GoTaq Flexi (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) según las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de ciclaje fueron incubación a 95°C por 2 minutos, denaturación 95°C por 30 segundos, anillamiento de primers 50-52°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, se manejaron 35 ciclos. Para todas las PCR se utilizó el termociclador BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). En la tabla 3, se muestran los primers utilizados para cada uno de los genes y los respectivos exones amplificados. Los primers empleados amplifican los exones de cada uno de los genes, en los cuales se han detectado mutaciones puntuales con cambio de sentido en CaP.

Para la electroforesis, se utilizaron cámaras BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), se prepararon geles de agarosa al 1,5% y 2% dado el tamaño de pb de los amplímeros esperados, se realizó la tinción de gel usando SYBR Safe (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Para la corrida de los amplímeros, se usaron 5µl de muestra por 0,5µl de Buffer Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La lectura de los geles fue realizada mediante un fotodocumentador BIO-RAD versión 5 utilizando el software ImagenLab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA).

Tabla 3. Descripción de los primers y las condiciones de temperatura de anillamiento (Ta) utilizadas para la amplificación mediante PCR.

Gen	Exón	Primer	Tamaño (pb)	Ta (°C)	Ref.
SPOP	6	F 5'-ACCCATAGCTTTGGTTTCTTCTCCC-3'	170	55	[18]
		R 5'-TATCTGTTTTGGACAGGTGTTTGCG-3'			
SPOP	7	F 5'-ACTCATCAGATCTGGAACTGC-3'	240	55	
		R 5'-AGTTGTGGCTTTGATCTGGTT-3'			
FOXA1	2	F 5'-AGCAAGATGCTCACGCTGA-3'	246	58	[32]
		R 5'-TCTCGCACTTGAAGCGCTT-3'			
IDH1	4	F 5'-TACCAAATGGCACCATAC-3'	180	50-54	
		R 5'-TCTCTACTTTTCCAGGCC-3'			
IDH1	4	F 5'-AATGAGCTCTATATGCCATCACTG-3'	499	50-62	[227]
		R 5'-TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT-3'			

Se realizó purificación de los productos de PCR a partir de banda de gel de agarosa empleando el KIT GFX™ PCR DNA AND Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) según las recomendaciones del fabricante. En los casos que fue necesario, se realizó reamplificación a partir de producto de PCR purificado, tomando 1 µl de amplímero y siguiendo con las condiciones de ciclaje mencionadas anteriormente. En los casos que fue necesario se realizó purificación de las reamplificaciones para posterior secuenciación.

Para la obtención de las secuencias, se realizó primero la cuantificación de los amplímeros mediante el KIT Qubit™ dsDNA HS usando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) obteniendo la concentración por muestra (ng/µl). Posteriormente, se realizó secuenciación Sanger utilizando el KIT BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, Foster City, California, EUA) usando los mismos primers de la PCR, las condiciones de reacción fueron incubación a 96°C por 1 minuto, denaturación a 96°C por 10 segundos, anillamiento de primers a 50°C por 5 segundos y extensión a 60°C por 4 minutos, se manejaron 25 ciclos, las secuencias fueron purificadas de acuerdo al protocolo del KIT BigDye X Terminator (Applied Biosystem, Foster City, California, EUA) y las secuencias se obtuvieron en el analizador genético 3500 (Applied Biosystem, Foster City, California, EUA).

Algunas de las secuencias se obtuvieron como prestación de servicio técnico de secuenciación Sanger de la Universidad Nacional de Colombia. La verificación de las secuencias obtenidas se realizó mediante la herramienta BLAST de NCBI, el análisis de los electroferogramas fue realizado mediante el programa SnapGene Viewer y el empalme con las secuencias teóricas se generó utilizando el programa CLC Sequence Viewer 8. Dados los resultados se dio la clasificación en ausencia o presencia de mutación según el caso.

5.4 Plan de análisis

5.4.1 Variables a analizar

Variable	Tipo de variable	Categorías
Edad	Continua	Edad en años
PSA inicial	Continua	PSA (ng/ml)
Puntaje de Gleason	Categórica	6, 7, ≥ 8
Grupo Grado de Gleason	Categórica	GG1, GG2, GG3, GG4 y GG5
Estadificación clínica	Categórica	cTNM
Estadificación patológica	Categórica	pTNM
Compromiso de márgenes	Categórica	Si, No
Compromiso de ganglios	Categórica	Si, No
Fecha de cirugía	Continua	Año
Recurrencia Bioquímica a 5 años	Categórica	Si, No, Sin dato (SD)
Fecha de Recurrencia Bioquímica	Continua	Año
PSA de Recurrencia Bioquímica	Continua	PSA (ng/ml)
Tiempo de Recurrencia Bioquímica de acuerdo al seguimiento INC	Categórica	1-3 meses (1 seguimiento), 4-6 meses (2 seguimiento), > 6 meses (3 seguimiento)
Fecha de muerte según registraduría	Continua	Año
Fecha de último seguimiento PSA	Continua	Año
Fusión TMRSS2-ERG	Categórica	Presencia, Ausencia
Mutaciones en <i>SPOP</i>	Categórica	Presencia, Ausencia
Mutaciones en <i>FOXA1</i>	Categórica	Presencia, Ausencia
Mutaciones en <i>IDH1</i>	Categórica	Presencia, Ausencia

5.4.2 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en R (versión 3.1.2). Se realizó una descripción de cada una de las variables de interés con respecto a los grupos de estudio. Se evaluó la asociación entre los subtipos determinados y las variables clínico-patológicas, incluida la edad, el PSA inicial, la puntuación de Gleason, el compromiso de bordes, compromiso de ganglios linfáticos, estadio clínico y estadio patológico. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors para corroborar la distribución normal de las variables continuas; con distribución normal se evaluó la asociación mediante la prueba de t de Student, de lo contrario, se usaron pruebas no paramétricas como test de Kruskal-Wallis. En el caso de variables categóricas se evaluó la asociación mediante la

prueba de chi cuadrado. También se evaluó la asociación entre los subtipos y el estado del paciente, teniendo en cuenta la recurrencia bioquímica y la supervivencia global mediante análisis de Kaplan-Meier. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $p < 0,05$.

5.4.3 Consideraciones éticas

De acuerdo con 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 clasificó como “INVESTIGACIÓN SIN RIESGO”. El proyecto se realizó 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. Igualmente, la información sobre las variables clínicas fue tomada de las bases de datos del proyecto base. Al ser un estudio planteado para trabajar con material de archivo, fue sin riesgo y no requirió de consentimiento informado.

6. Resultados

6.1 Características clínico-patológicas de los pacientes

Las características clínico-patológicas de 112 pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes.

Parámetros	Total (N=112) N=%
Edad	
Median [Min, Max]	63,7 [42,3; 74,6]
iPSA (ng/ml)	
Median [Min, Max]	8,74 [1,58; 101]
Puntaje de Gleason	
6	30 (26,8)
7	69 (61,6)
≥8	13 (11,6)
Grupo Grado de Gleason	
GG1 (6)	30 (26,8)
GG2 (3+4)	39 (34,8)
GG3 (4+3)	30 (26,8)
GG4 (8)	8,0 (7,1)
GG5 (9-10)	5,0 (4,5)
cT	
cT1-2a	68 (60,7)
cT2b	26 (23,2)
≥cT2c	16 (14,3)
SD	2,0 (1,8)
pT	
≤pT2b	10 (8,9)
pT2c	52 (46,4)
pT3a	33 (29,5)
≥pT3b	17 (15,2)
pN	
pN0	95 (84,8)

pN1	12 (10,7)
pNX	5,0 (4,5)
Márgenes	
No	57 (50,9)
Si	55 (49,1)
Ganglios	
No	99 (88,4)
Si	13 (11,6)
BCR a 5 años (N=80)*	
Si	46 (57,5)
No	34 (42,5)
Tiempo a la BCR - años (N=46)	
1-3 meses (1 seguimiento)	11 (9,8)
4-6 meses (2 seguimiento)	7,0 (6,2)
> 6 meses (3 seguimiento)	28 (25)
Supervivencia libre de BCR - años (N=80)*	
Mediana [Min; Max]	5,0 [1; 8]
Supervivencia Global - años (N=112)	
Mediana [Min; Max]	10 [1; 11]
Fusión TMPRSS2-ERG	
Presencia	71 (63,4)
Ausencia	41 (36,6)
Mutaciones en SPOP (N=41**)	
Presencia	2 (4,90)
Ausencia	39 (95,1)
Mutaciones en FOXA1 (N=41**)	
Presencia	0
Ausencia	41 (100%)

BCR: Recurrencia bioquímica *: La BCR sólo se analizó en los pacientes que tuvieron un seguimiento >5 años. **: Las mutaciones sólo se buscaron en los 41 pacientes ETS-. SD: Sin Dato.

La mediana de edad de pacientes incluidos en el estudio fue de 63,7 años, la de los niveles de PSA inicial fue de 8,74 ng/ml, el puntaje de Gleason más frecuente fue de 7 (61,6%) correlacionado al GG2 (34,8%), estadio patológico pT2c (46,4%) y no presentaron compromiso de ganglios (88,4%). Se logró tener un seguimiento mínimo de 5 años de 80 pacientes de los cuales 46 (57,5%) tuvieron BCR, el tiempo de recurrencia entre estos pacientes fue en su mayoría luego de los 6 meses de la prostatectomía radical (25%), aunque algunos pacientes tuvieron recurrencia entre 1 y 3 meses (9,8%) y entre 4 y 6 meses (6,2%).

6.2 Detección de fusiones TMPRSS2-ERG

Mediante los análisis de FISH realizados en los 112 casos se encontraron 71 casos con presencia de fusión (63,4%) y 41 con ausencia (36,6%). En los casos con presencia de fusión, se hallaron diferentes rearrreglos cromosómicos dentro de un mismo corte, como translocaciones TMPRSS2, ERG y deleciones en 57 muestras (80,3%), translocaciones TMPRSS2 y ERG en 6 muestras (8,5%), translocaciones ERG y deleciones en 4 muestras (5,6%) y translocaciones TMPRSS2 y deleciones en 4 muestras (5,6%) (Figura 16). Los 41 casos con ausencia de fusión fueron seleccionados para la evaluación de las mutaciones en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*.

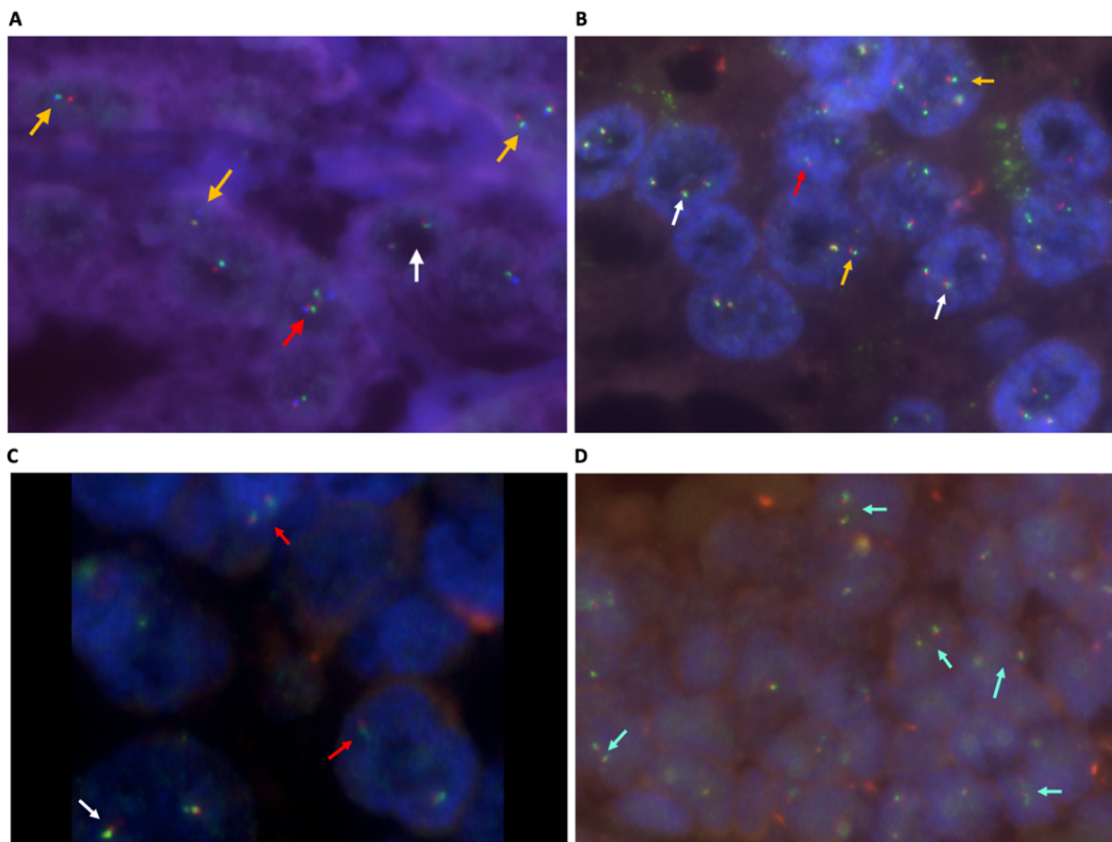


Figura 16. Resultados de FISH de 4 pacientes. **A y B.** Pacientes con presencia de fusión con translocaciones de TMPRSS2 (flechas amarillas: 1 señal azul-verde y/o 1 señal roja), translocación ERG (flechas blancas: 1 señal verde-rojo y/o 1 señal azul) y deleción (flecha roja: 1 señal azul-roja). **C.** Paciente con presencia de fusión con deleción flecha roja: 1 señal azul-roja) y translocación ERG flechas blancas: 1 señal verde-rojo y 1 señal azul). **D.** Paciente con ausencia de la fusión (flechas azules, 2 señales rojo-verde-azul).

6.3 Extracción de ADN de tejidos FFPE

La extracción de ADN fue realizada para los 41 casos con ausencia de fusión obteniendo concentraciones entre 0,986 y 80,4 ng/ml con una media de 12,71 ng/ml y mediana de 7,45 ng/ml.

6.4 Detección de mutaciones de SPOP

6.4.1 Estandarización de PCR y secuenciación Sanger

Fueron establecidas las condiciones óptimas para la amplificación mediante PCR. La Taq de alta fidelidad empleada establecía condiciones de temperatura de anillamiento de 55°C, sin embargo, se realizó un gradiente de temperatura para el anillamiento de los primers, abarcando el T_m calculado entre los primers, para evidenciar el mejor resultado. La estandarización se realizó con ADN de sangre y tejido sano FFPE a un volumen final de 50µl, como control de la PCR se usó β-globina (Figura 17). De acuerdo con los resultados se eligió 55°C para el procesamiento de las muestras FFPE tumorales.

Se realizó la purificación de las muestras para posterior secuenciación, los electroferogramas y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias teóricas para corroborar la especificidad de los primers (Figura 18).

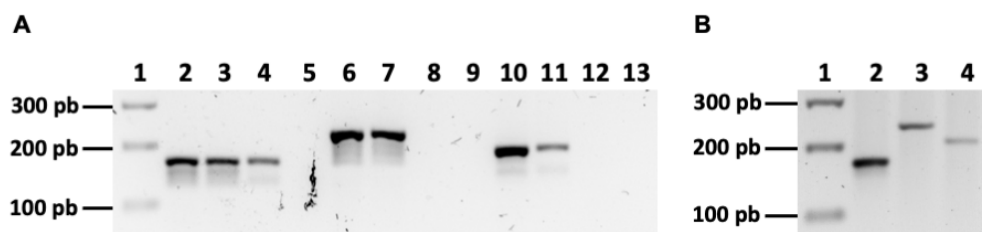
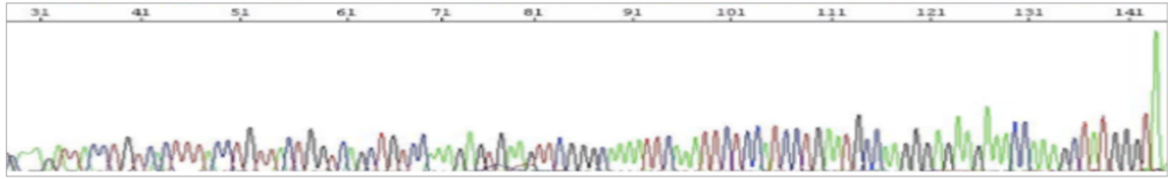


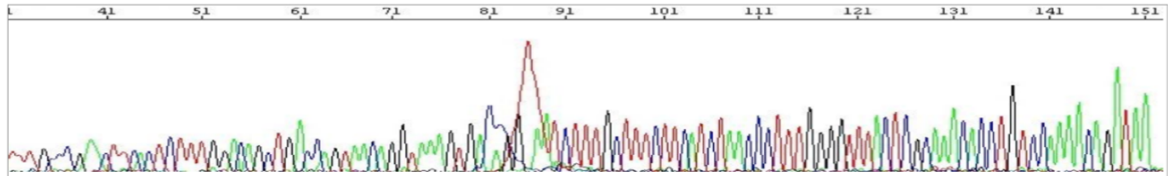
Figura 17. Estandarización de PCR exón 6 y exón 7 de SPOP. **A.** Gradiente de temperatura de anillamiento a partir de ADN de sangre en gel de agarosa al 2,0%. 1: marcador de peso molecular, 2-5: Exón 6 (170 pb), 2: 55°C, 3: 60°C, 4: 68°C, 5: control negativo, 6-9: Exón 7 (240 pb), 6: 55°C, 7: 60°C, 8: 68°C, 9: control negativo, 10-13: β-globina, 10: 55°C, 11: 58°C, 12: 68°C y 13: control negativo. **B.** Amplificación de exón 6 y 7, gel a partir de ADN de tejido sano FFPE 1: marcador de peso molecular, 2: exón 6 a 55°C, 3: exón 7 a 55°C, 4: β-globina a 55°C.

A

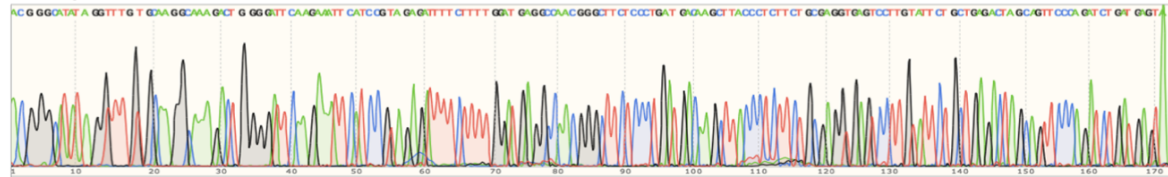
Exón 6 primer Forward



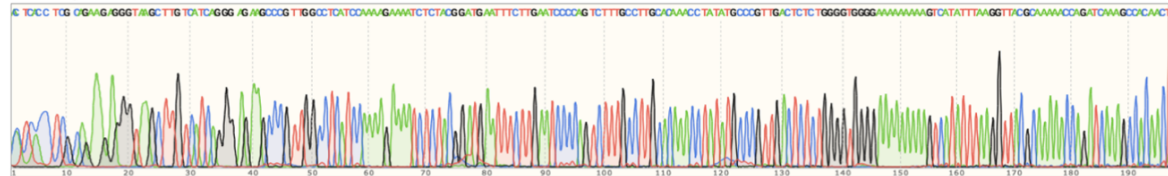
Exón 6 primer Reverse



Exón 7 primer Forward

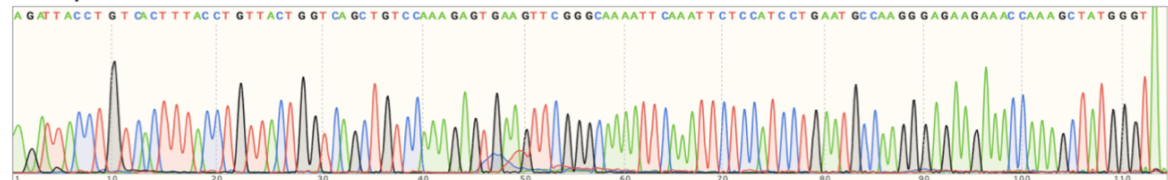


Exón 7 primer Reverse



B

Exón 6 primer Forward



Exón 7 primer Reverse

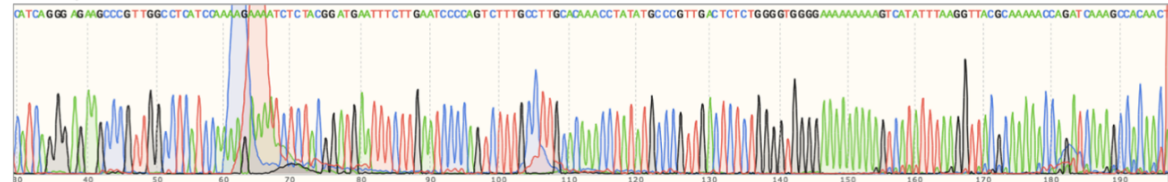


Figura 18. Secuencias del exón 6 y exón 7 de *SPOP*. A. Secuencia a de ADN de sangre. **B.** Secuencia a partir de ADN de tejido sano FFPE, exón 6 secuenciado con primer Forward y exón 7 secuenciado con primer Reverse.

Para el caso de las muestras de ADN de sangre, los dos primers funcionaron bien, pero en el caso de FFPE sano la secuencia del exón 6 con primer Reverse no arrojó resultado

y, por otro lado, la secuencia del exón 7 con primer Forward mostró ruido (Figura 18A). También se realizó secuenciación con los dos primers de los dos exones en algunas muestras FFPE de CaP, y los resultados fueron similares. Dado lo anterior, se decidió emplear para la secuenciación de las muestras FFPE de CaP restantes, el primer Forward para el caso del exón 6 y el primer Reverse para el exón 7 (Figura 18B). En los dos casos se abarcan las mutaciones puntuales más frecuentes reportadas hasta a la fecha para estos dos exones.

6.4.2 PCR y secuenciación de muestras FFPE de cáncer de próstata

Las mutaciones en los exones 6 y 7 de *SPOP* fueron evaluadas en los 41 casos con ausencia de fusión bajo las condiciones establecidas anteriormente. Se logró amplificar el exón 6 en todas las muestras, los amplímeros fueron purificados a partir de gel de agarosa y procesados para secuenciación (Figura 19A). Para el caso del exón 7, a pesar de que se observaron amplímeros estos no se generaron con la intensidad esperada, por lo tanto, se realizó purificación de todos los productos de PCR a partir de gel de agarosa y se reamplificaron. Para la reacción de secuencia fue necesario purificar nuevamente los productos obtenidos en gel de agarosa (Figura 19B).

En los 41 casos (36,6%) negativos para la fusión fueron halladas dos mutaciones en *SPOP* (4,9%). En uno de los casos (079) fue encontrada una mutación en el exón 6 (p.F102C – c.305T>G) y en otro caso (042) fue detectada una mutación en el exón 7 (p.F133L – c.399C>G). Dados los resultados se repitieron las amplificaciones y secuencias en cada caso para corroborar las mutaciones (Figura 20). Estas son mutaciones por cambio de sentido con pérdida de función que han sido reportadas previamente y se consideran como mutaciones oncogénicas.

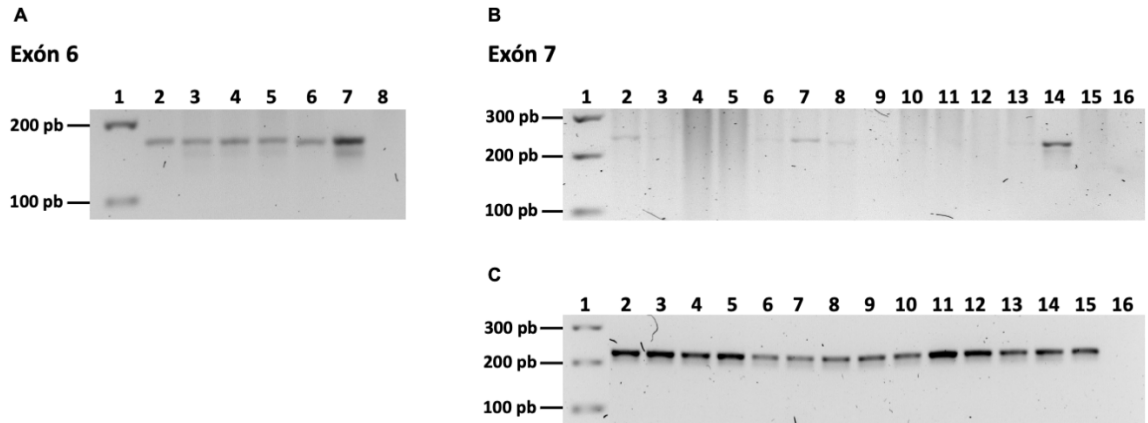


Figura 19. Amplificación del exón 6 y exón 7 de *SPOP* en muestras FFPE de cáncer de próstata. A. Exón 6 (170 pb), 1: marcador de peso molecular, 2-6: muestras FFPE, 7: control positivo (ADN de sangre), 8: control negativo. **B.** Exón 7 (240 pb), 1: marcador de peso molecular, 2-13: muestras CaP FFPE, 14: control positivo (ADN de sangre), 15: β -globina, 16: control negativo. **C.** Reamplificaciones exón 7; 1: marcador de peso molecular, 2-14: muestras FFPE 15: control positivo (ADN de sangre) y 16: control negativo.

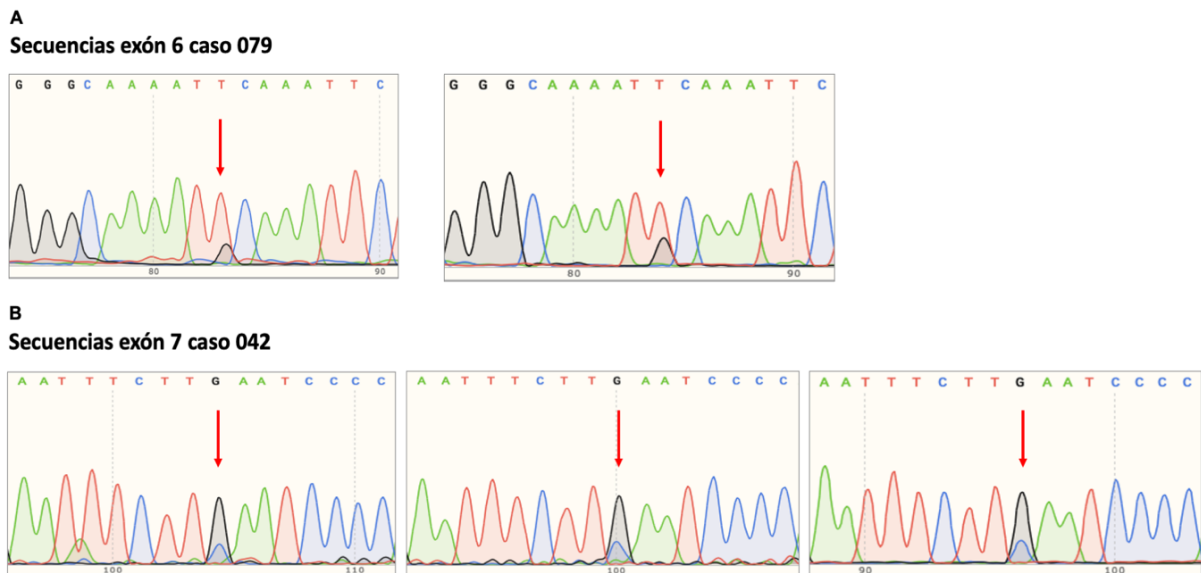


Figura 20. Mutaciones en *SPOP* en muestras FFPE de CaP. A. Mutación en exón 6. Electroferogramas obtenidos en dos amplificaciones diferentes del mismo caso (079). La flecha roja señala la mutación F102C (305T>G). **B.** Mutación en exón 7. Electroferogramas obtenidos en tres amplificaciones diferentes del mismo caso (042). La flecha roja indica la mutación F133L (399C>G).

6.4.3 Mutaciones de *SPOP* halladas y análisis con variables clínico-patológicas de los pacientes

De acuerdo con los datos de los pacientes con las mutaciones, se evidenció que el paciente que presentaba la mutación en el exón 6 tenía una edad de diagnóstico superior a la mediana para esta población (68 años), también un valor de PSA inicial superior (15,5 ng/ml), un puntaje de Gleason de 4+3 caracterizado en GG3 y se había realizado tratamiento adicional de orquidectomía, ya que el paciente tuvo BCR 6 años después de la cirugía. Adicionalmente, el paciente presentaba compromiso de bordes y un estadio patológico T3b con posible compromiso de vesículas seminales, el paciente falleció.

Por otro lado, el paciente que arrojó la mutación en el exón 7 mostraba una edad de diagnóstico menor a la mediana (60 años), niveles de PSA inicial mayores (12,5 ng/ml), un puntaje de Gleason de 4+4 clasificado en el GG4 y manejó tratamiento adicional con acetato de Leuprolide, un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina, debido a que el paciente presentó BCR 7 años posterior a la cirugía. Este paciente tenía antecedentes familiares del padre con CaP y una hermana con cáncer de mama, lo que podría explicar la progresión de la enfermedad. En cáncer de mama, se ha encontrado una baja expresión de *SPOP* asociada al incremento en la expresión de algunos sustratos como el receptor de progesterona o el supresor 1 de metástasis de cáncer de mama, fuertemente asociados a la progresión del ciclo celular, aunque también se han encontrado mutaciones de *SPOP* en este tipo de cáncer, no se han asociado a progresión de la enfermedad [142,158]. Teniendo en cuenta esto, podría existir una relación entre la mutación encontrada y los antecedentes familiares, no obstante, no es posible corroborar esto.

Estos resultados podrían sugerir una asociación hacia un pronóstico de progresión tumoral, a pesar de esto, ya que el número de pacientes con la mutación fue bajo, no fue posible realizar los análisis de asociación con las variables clínico-patológicas, para determinar alguna asociación significativa a pronóstico.

6.5 Análisis de mutaciones en *SPOP* en múltiples focos

Teniendo en cuenta que de los 112 casos analizados solo 18 tenían disponible material con HGPIIN y que de estos 18 ninguna muestra pertenecía a los dos casos con mutaciones de *SPOP*, se decidieron tomar los focos disponibles de cada uno de los casos y adicionalmente tejido adyacente no tumoral, para evaluar las mutaciones en múltiples focos.

6.5.1 Selección y extracción de ADN de muestras FFPE de casos con mutaciones en *SPOP*

Para el caso de la muestra 079, con mutación en el exón 6 de *SPOP*, se tenían 3 bloques disponibles, de los cuales se tomaron 3 focos de Gleason 4 y 3 de tejido adyacente no tumoral. En el caso 042 con mutación en el exón 7, se contaba con 2 bloques y se tomaron 2 focos de Gleason 4 y 2 de tejido adyacente no tumoral. La extracción de ADN fue realizada para las 10 muestras obteniendo concentraciones entre 4,88 y 16,15 ng/ml con una media de 10,6 ng/ml y mediana de 10,9 ng/ml.

6.5.2 PCR y secuenciación Sanger de muestras FFPE de los casos con mutaciones en *SPOP*

La PCR se realizó bajo las condiciones establecidas previamente para las muestras FFPE. Fue posible amplificar los exones 6 y 7 en todas las muestras (Figura 21A). Posteriormente se realizó purificación y reamplificación para secuenciación (Figura 21B y C). Se detectó la mutación en el exón 6 de *SPOP* del caso 079 hallada anteriormente, en uno de los focos tumorales con Gleason 4, y el tejido no tumoral adyacente no presentó esta mutación. De la misma manera, se encontró mutación en el exón 7 de *SPOP* en uno de los focos tumorales con Gleason 4 del caso 042 y el tejido adyacente no tumoral no presentó dicha mutación. Estos hechos resaltan la mutación de *SPOP* como un evento de aparición tumoral. Por otro lado, no se encontraron mutaciones en las otras muestras analizadas, lo cual destaca la multifocalidad descrita en CaP. Se realizarán nuevas PCR para la confirmación de las mutaciones en estas muestras.

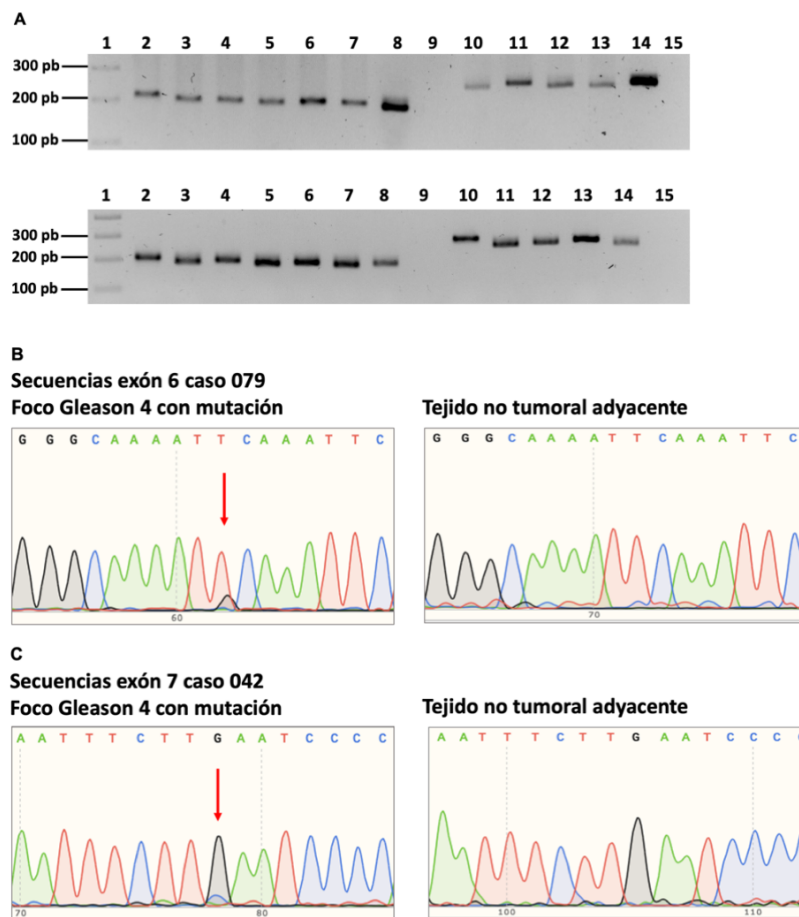


Figura 21. Amplificación de exón 6 y 7 de *SPOP* en muestras FFPE tumorales y no tumorales de los casos con mutaciones (042 y 079). **A.** Imagen superior, 1: marcador de peso molecular, Exón 6 caso 079 (170 pb): 2-7: muestras FFPE, 8: control positivo (ADN de sangre), 9: control negativo. Exón 7 caso 042 (240 pb): 10-13: muestras FFPE, 14: control positivo (ADN de sangre), 15: control negativo. Imagen inferior reamplificación, 1: marcador de peso molecular, Exón 6 caso 079 (170 pb): 2-7: muestras FFPE, 8: control positivo (ADN de sangre), 9: control negativo. Exón 7 caso 042 (240 pb): 10-13: muestras FFPE, 14: control positivo (ADN de sangre), 15: control negativo. **B.** Electroferogramas obtenidos de uno de los focos Gleason 4 del caso 079 con mutación en exón 6 y secuencia del tejido no tumoral con ausencia de la mutación. **C.** Electroferogramas obtenidos de uno de los focos Gleason 4 del caso 042 con mutación en exón 7 y secuencia del tejido no tumoral con ausencia de la mutación.

6.6 Detección de mutaciones de *FOXA1*

6.6.1 Estandarización de PCR y secuenciación Sanger

Inicialmente fueron establecidas las condiciones óptimas para la amplificación mediante PCR. Se realizó un gradiente de la temperatura en el anillamiento de los primers,

abarcando el t_m calculado entre los primers y el t_m propuesto de la Taq, para evidenciar el mejor resultado. La estandarización se realizó con ADN de sangre y tejido sano FFPE a un volumen final de 25 μ l, como control de la PCR se usó β -globina (Figura 22A y B). De acuerdo con los resultados se eligió 58°C para el procesamiento de las muestras FFPE tumorales.

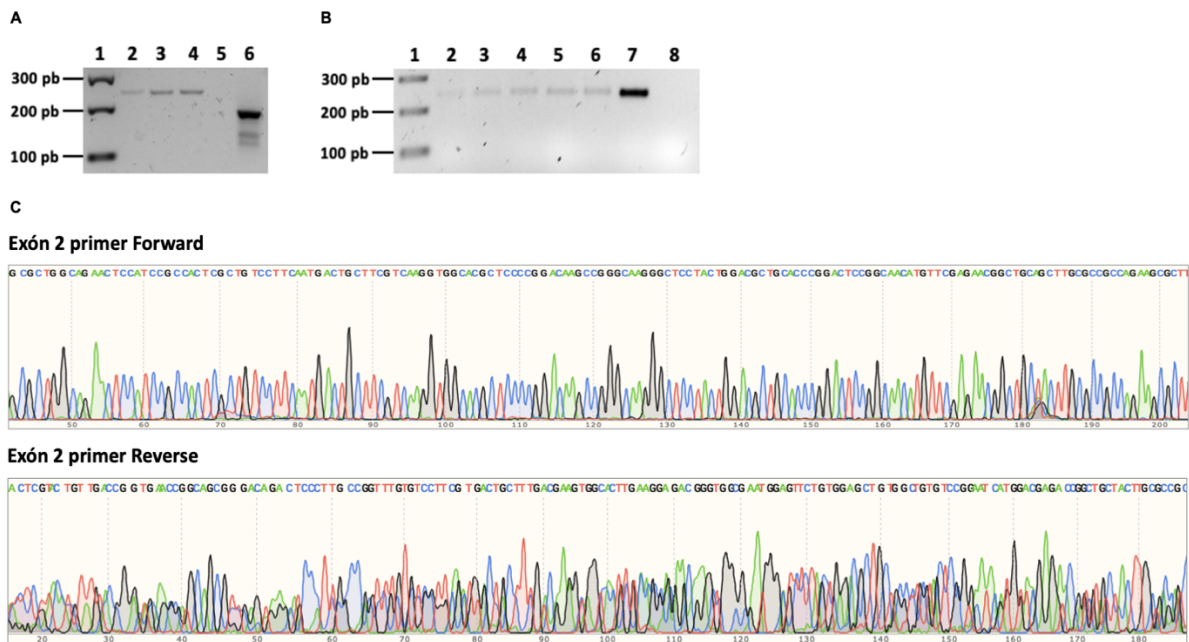


Figura 22. Estandarización de PCR del exón 2 de FOXA1 (246 pb). **A.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 2,0%, a partir de ADN de sangre. 1: marcador de peso molecular, 2: 52°C, 3: 58°C, 4: 62°C, 5: control negativo, 6: β -globina t_m 55°C. **B.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 2,0%, a partir de ADN de tejido sano FFPE . 1: marcador de peso molecular, 2: 56°C, 3: 57°C, 4: 58°C, 5: 59°C, 6: 60°C, 7: control positivo (ADN de sangre) y 8: control negativo. **C.** Electroferogramas obtenidos con cada uno de los primers a partir del producto purificado de ADN de sangre.

Se realizó la purificación de los amplímeros obtenidos de ADN de sangre para posterior secuenciación, los electroferogramas y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias teóricas para corroborar la especificidad de los primers. Dados los resultados de secuenciación, con ambos primers, se decidió emplear en el procesamiento de las muestras FFPE el primer Forward, el cual abarca las mutaciones puntuales más frecuentes reportadas hasta la fecha para el exón 2 de FOXA1 (Figura 22C).

6.6.2 PCR y secuenciación de muestras FFPE de cáncer de próstata

Las mutaciones del exón 2 de *FOXA1* fueron evaluadas en los 41 casos con ausencia de fusión bajo las condiciones establecidas anteriormente. Se logró amplificar el exón en las muestras, pero las bandas no se observaron con la intensidad esperada, por lo tanto, se realizó purificación de todos los productos de PCR a partir de gel de agarosa y se reamplificaron (Figura 23). No se encontraron mutaciones en ninguna de las muestras analizadas.

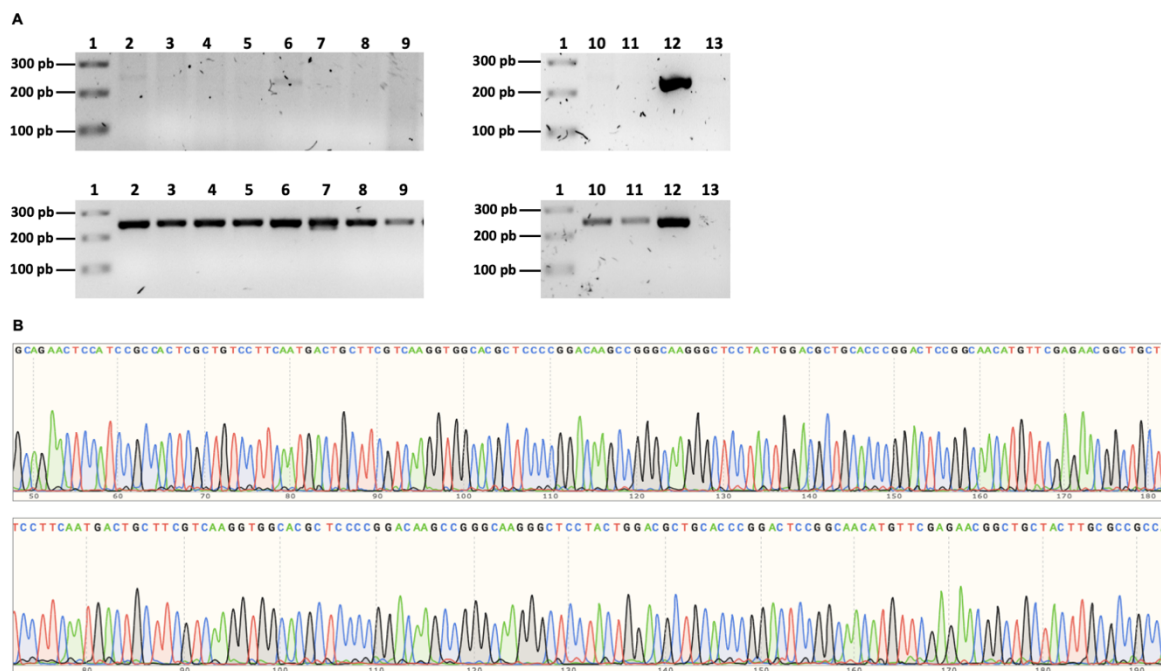


Figura 23. Amplificación de exón 2 de *FOXA1* (246 pb) en muestras FFPE de cáncer de próstata. A. Imagen superior 1: marcador de peso molecular, 2-11: muestras FFPE, 12: control positivo (ADN de sangre), 13: control negativo. Imagen inferior: reamplificaciones de las mismas muestras. **B.** Electroferogramas obtenidos con primer Forward de los casos 018 y 040.

6.7 Detección de mutaciones de *IDH1*

6.7.1 Estandarización de PCR y secuenciación Sanger primers para el amplímero de 180 pb

Para la estandarización de la PCR se empleó inicialmente ADN de sangre a un volumen final de 25µl. Se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento de los primers,

tomando temperaturas entre 52°C y 60°C. Se obtuvo una banda alrededor del peso esperado, 180 pb, pero se observaron inespecificidades, de pesos moleculares entre 360 y 450 pb (Figura 24A). Teniendo en cuenta que el ADN extraído de FFPE podría no amplificar bandas de estos tamaños, se realizó la PCR con ADN de FFPE sano tomando un gradiente de temperatura de anillamiento entre 50°C y 60°C, en este caso se observaron bandas en el peso esperado, pero muy tenues y también se mantuvieron algunas inespecificidades de pesos moleculares cercanos a 120 pb (Figura 24B). Aunque se hicieron varios ensayos a partir de ADN de sangre y FFPE, no se lograron disminuir las inespecificidades y por esta razón se decidió purificar los productos conseguidos y posteriormente secuenciar.

Los electroferogramas y las secuencias obtenidas con las muestras de ADN de sangre mostraron mucho ruido (Figura 24C) y se realizó BLAST en la plataforma de NCBI con la parte de la secuencia obtenida del primer Forward que podía leerse mejor (desde la base 90), observando un acoplamiento con secuencia de *IDH1* de humano, en el caso del primer Reverse se realizó el mismo proceso tomando la última parte de la secuencia (desde la base 90) para realizar el BLAST, pero no se obtuvo resultados de similitud. Se realizó un acoplamiento entre la secuencia teórica esperada y la secuencia obtenida con el primer Forward, evidenciando que el acoplamiento se daba al final de las secuencias y que las regiones que contienen los puntos de mutación reportados no presentaron buenos resultados de lectura (Figura 24C y D). En las muestras de FFPE no se logró obtener secuencia, esto pudo deberse a que en el proceso de purificación se pierde material, sin embargo, se decidió realizar reamplificación, pero seguían obteniéndose inespecificidades y las secuencias no eran las esperadas.

Debido a los resultados obtenidos y a los múltiples intentos en los que no se conseguían los resultados esperados, se realizó la revisión y los primers fueron tomados de un artículo (Tabla 3) en donde la muestra de partida inicial para en análisis de las mutaciones de *IDH1* fue cDNA, teniendo en cuenta que en el presente estudio se emplea ADN genómico por esta razón no se obtuvo buenos resultados para realizar la evaluación de las mutaciones [32].

Se revisó nuevamente en la literatura los primers que podrían emplearse para el análisis y se seleccionaron unos primers que amplificaban 499 pb (Tabla 3) y cubrían los puntos de mutación reportados para *IDH1* [227].

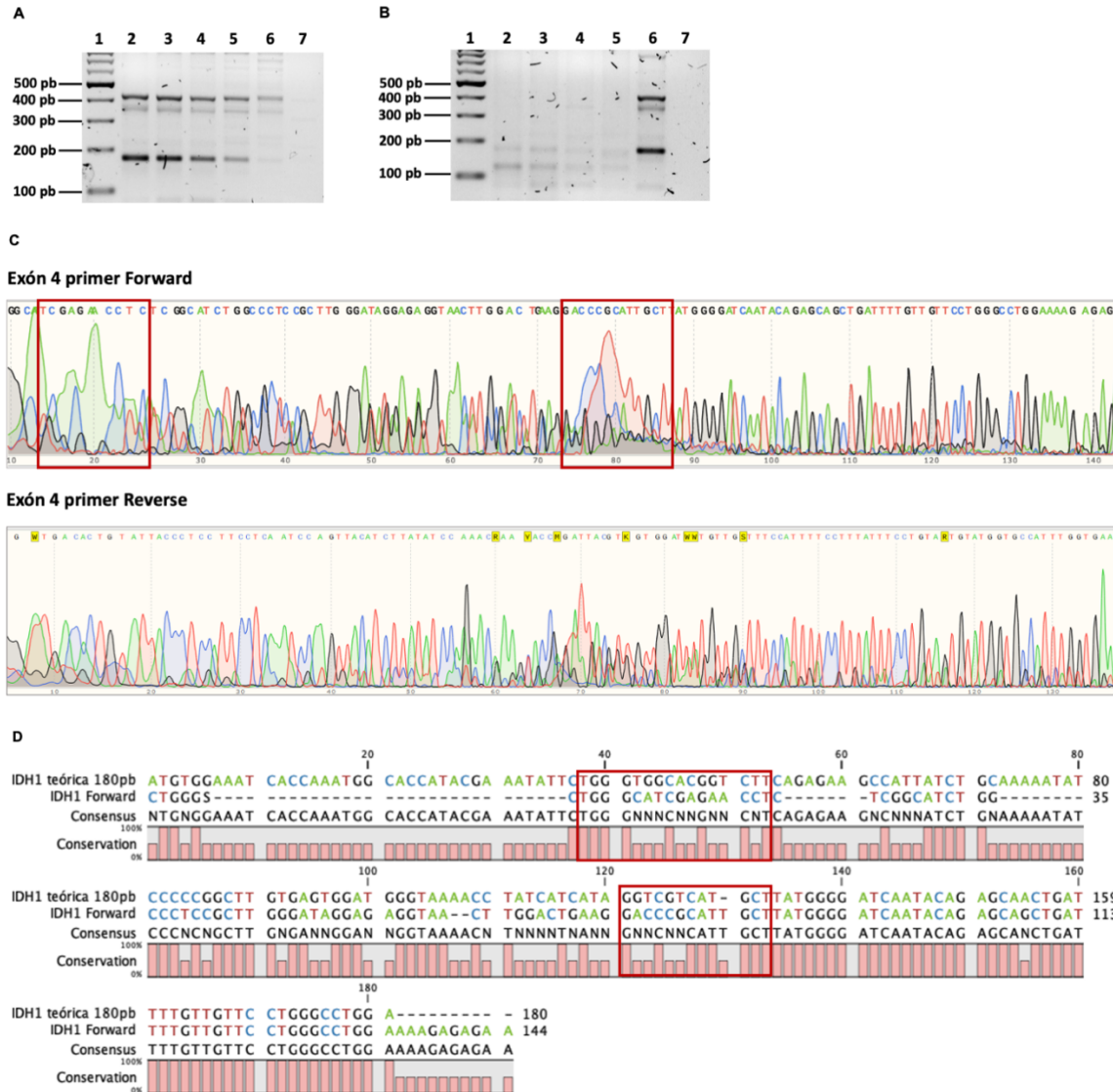


Figura 24. Estandarización de PCR del exón 4 de IDH1 (180 pb). **A.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 2,0%, a partir de ADN de sangre. 1: marcador de peso molecular, 2: 52°C, 3: 54°C, 4: 56°C, 5: 58°C, 6: 60°C, 7: control negativo. **B.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 2,0%, a partir de ADN de tejido sano FFPE. 1: marcador de peso molecular, 2: 50°C, 3: 55°C, 4: 58°C, 5: 60°C, 6: control positivo (ADN de sangre) y 7: control negativo. **C.** Electroferogramas obtenidos con cada uno de los primers a partir del producto purificado de ADN de sangre. **D.** Acoplamiento entre la secuencia teórica esperada (180 pb) y la secuencia obtenida con primer Forward. Los cuadros en rojo indican las regiones en donde se encuentran los puntos de mutación reportados para *IDH1* en cáncer de próstata.

Adicionalmente, para contrastar los resultados se decidió realizar PCR de IDH1 con estos primers usando cDNA a partir de ARN de sangre. Para la PCR se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento de los primers, tomando temperaturas entre 52°C y 58°C. Se obtuvo una banda intensa alrededor del peso esperado, 180 pb y se observaron inespecificidades muy tenues de pesos moleculares entre 250 y 450 pb, las cuales disminuyen al aumentar la temperatura (Figura 25A). De acuerdo con esto, se realizó purificación del fragmento y posterior secuenciación. Los electroferogramas obtenidos de estas secuencias muestran ruido al inicio, pero mejoran al final (Figura 25B), al realizar el BLAST con la parte final de las secuencias (desde la base 80), se obtiene un acoplamiento con la secuencia de IDH1 de humano con los dos primers. Se espera continuar con los ensayos para mejorar los resultados de las secuencias y probar esto a partir de cDNA de tejido FFPE.

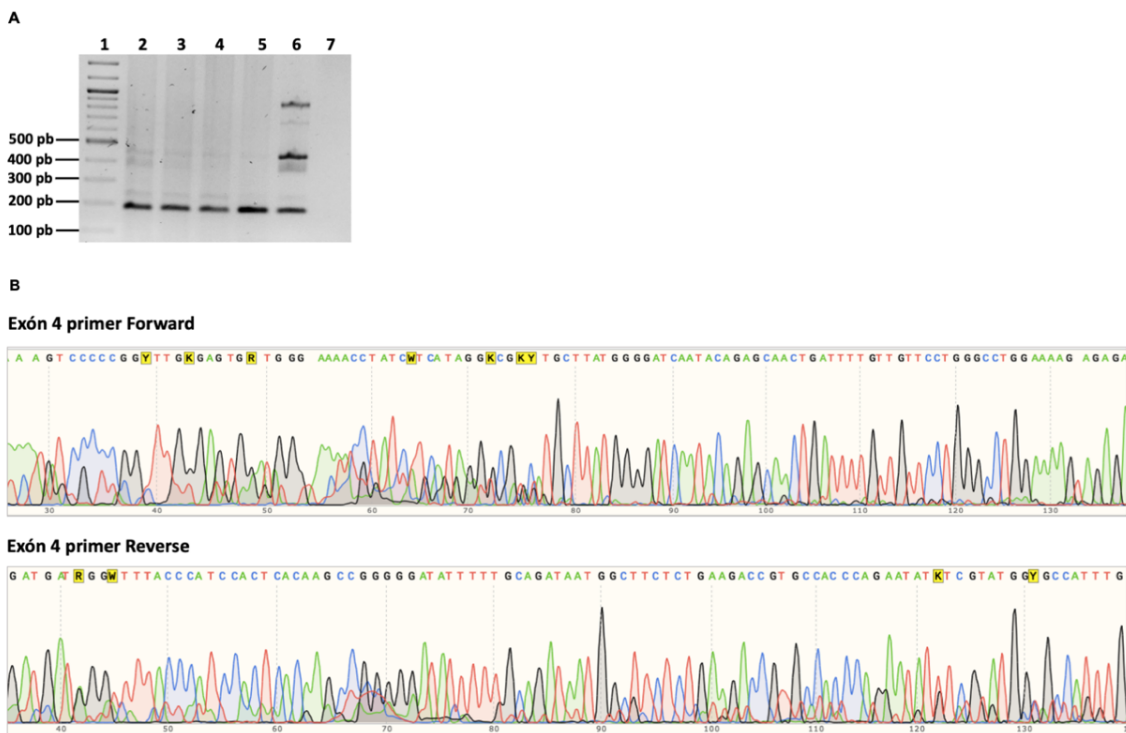


Figura 25. PCR del exón 4 de IDH1 (180 pb) a partir de cDNA. A. Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 2,0%, a partir de cDNA. 1: marcador de peso molecular, 2: 52°C, 3: 54°C, 4: 56°C, 5: 58°C, 6: control positivo (ADN de sangre) y 7: control negativo. **B.** Electroferogramas obtenidos con cada uno de los primers a partir del producto purificado de cDNA.

6.7.2 Estandarización de PCR y secuenciación Sanger primers para el amplímero de 499pb

Debido a los problemas para la estandarización de la PCR y secuencia de *IDH1* con los primers inicialmente escogidos, que describimos anteriormente, se seleccionaron otros primers que amplificaban un fragmento de 499 pb. Para la estandarización de la PCR se empleó inicialmente ADN de sangre a un volumen final de 25µl. Se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento de los primers, tomando temperaturas entre 52°C y 62°C, obteniendo buenas bandas de amplificación en todas las temperaturas y como control de la PCR se usó β-globina (Figura 26A). Teniendo en cuenta los productos obtenidos se procedió con la secuenciación, los electroferogramas y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias teóricas para corroborar la especificidad de los primers, se obtuvo el resultado esperado en esta muestra con primer Forward (Figura 26B), ya que el reverse presenta ruido de fondo.

En el caso de las muestras de tejido sano FFPE, se usaron las mismas condiciones de la PCR, pero se realizó un gradiente con temperaturas de anillamiento más bajas entre 48°C y 54°C teniendo en cuenta que el ADN extraído de los FFPE se encuentra degradado en comparación con el de sangre (Figura 26C). Dado que se observó una amplificación en el tamaño esperado, pero con inespecificidades de pesos moleculares entre 360 pb y 140 pb, pero que al aumentar la temperatura de anillamiento, se generaba más producto y disminuía la inespecificidad, se empleó un gradiente de temperatura de anillamiento mayor, entre 54°C y 62°C, se observó la presencia de bandas tenues, pero sin especificidad a 54°C y 56°C (Figura 26D), por lo que se decidió reamplificar, sin embargo, se obtuvo bandas de bajos pesos moleculares y no se reamplificaron las del peso esperado. Adicionalmente, se realizó una prueba con muestras FFPE tumorales, tomando 3 temperaturas diferentes, pero no amplificaron.

Teniendo en cuenta estos resultados no se logró realizar el análisis de las mutaciones de *IDH1* en las muestras a evaluar. Estos resultados pueden deberse a la fragmentación y degradación que sufre el ADN en el proceso de parafinización, por lo que obtener amplímeros de grandes tamaños puede ser complicado, particularmente con muestras FFPE tumorales.

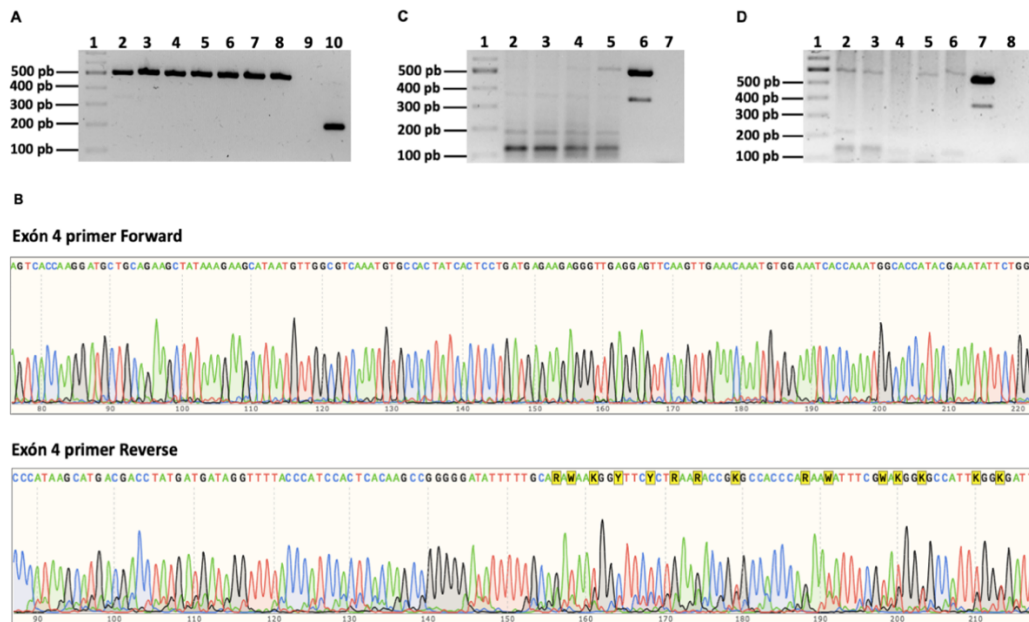


Figura 26. Estandarización de PCR del exón 4 de *IDH1* (499 pb). **A.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 1,5%, a partir de sangre 1: marcador de peso molecular, 2: 52°C, 3: 54°C, 4: 56°C, 5: 58°C, 6: 60°C, 7: 61°C, 8: 62°C, 9: control negativo, 10: β -globina tm 55°C. **B.** Secuencias y electroferogramas obtenidos con cada uno de los primers a partir del producto de PCR de ADN de sangre. **C.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 1,5%, a partir de ADN de tejido sano FFPE. 1: marcador de peso molecular, 2: 48°C, 3: 50°C, 4: 52°C, 5: 54°C, 6: control positivo (ADN de sangre) y 8: control negativo. **D.** Gradiente de temperatura de anillamiento en gel de agarosa al 1,5%, a partir de ADN de tejido sano FFPE. 1: marcador de peso molecular, 2: 54°C, 3: 56°C, 4: 58°C, 5: 60°C, 6: 62°C, 7: control positivo con ADN de sangre y 8: control negativo. La banda obtenida no corresponde al tamaño esperado (aprox. 600 pb).

6.8 Asociación del estado de fusión *TMPRSS2-ERG* con parámetros clínico-patológicos

Teniendo en cuenta la clasificación entre los 71 pacientes con presencia (63,4%) y los 41 pacientes con ausencia (36,6%) de fusión, se realizó la comparación entre estos dos grupos analizando cada una de las variables clínico-patológicas descritas (Tabla 6). Únicamente se encontraron diferencias entre el tiempo de BCR encontrando que una gran proporción de pacientes con presencia de fusión tuvieron BCR entre 1-3 meses (40%), mientras que para la mayoría de los pacientes con ausencia de fusión el tiempo de recaída fue >6 meses (71,4%), esto teniendo en cuenta los respectivos seguimientos que se realizan a los pacientes dentro del INC ($p=0,014$).

Tabla 5. Asociación del estado de fusión con parámetros clínico-patológicos.

Parámetros	Presencia (N=71) N (%)	Ausencia (N=41) N (%)	p-value
Edad			
Median [Min, Max]	63,4 [42,3; 73,7]	64,9 [48,3; 74,6]	0,356
iPSA (ng/ml)			
Median [Min, Max]	8,77 [1,58; 101]	8,6 [3,64; 84]	0,884
Puntaje de Gleason			
6	22 (31,0)	8 (19,5)	0,310
7	40 (56,3)	29 (70,7)	
≥8	9 (12,7)	4 (9,80)	
Grupo Grado de Gleason			
GG1 (6)	22 (31,0)	8 (19,5)	0,130
GG2 (3+4)	25 (35,2)	14 (34,1)	
GG3 (4+3)	15 (21,1)	15 (36,6)	
GG4 (8)	4 (5,60)	4 (9,80)	
GG5 (9-10)	5 (7,00)	0	
cT			
cT1-2a	43 (62,3)	25 (61)	0,125
cT2b	13 (18,8)	13 (31,7)	
≥cT2c	12 (18,8)	4 (8,7)	
pT			
≤pT2b	8 (11,3)	2 (4,9)	0,591
pT2c	34 (47,9)	18 (43,9)	
pT3a	19 (26,8)	14 (34,1)	
≥pT3b	10 (14,1)	7 (17,1)	
pN			
pN1	8 (11,3)	4 (9,8)	0,699
pN0	59 (83,1)	36 (87,8)	
pNX	4 (5,6)	1 (2,4)	
Márgenes			
No	40 (56,3)	17 (41,5)	0,187
Si	31 (43,7)	24 (58,5)	
Ganglios			
No	63 (88,7)	36 (87,8)	1.000
Si	8 (11,3)	5 (12,2)	
BCR a 5 años			
Si	25 (52,1)	21 (65,6)	0,332
No	23 (47,9)	11 (34,4)	
Tiempo BCR - años (N=46)			
1-3 meses (1 seguimiento)	10 (40,0)	1 (4,80)	0,014
4-6 meses (2 seguimiento)	2 (8,0)	5 (23,8)	
> 6 meses (3 seguimiento)	13 (52,0)	15 (71,4)	
Supervivencia libre de BCR - años (N=80)			
Mediana [Min; Max]	6 [0; 13]	3,5 [0; 11]	0,360
Supervivencia Global - años			
Media (SD)*	12,3 (0,26)	11,7 (0,44)	0,240

BCR: Recurrencia bioquímica. *Los valores de supervivencia global son medias, ya que dados los desenlaces a 10 años no fue posible calcular mediana.

6.8.1 Recurrencia bioquímica, supervivencia libre de recurrencia bioquímica y supervivencia global

La BCR a cinco años se consideró con niveles de PSA por encima de 0,2 ng/ml, luego del segundo seguimiento con el aumento. Fue analizada en 80 pacientes con una mediana de 51,78 meses [0,3; 154], ya que 32 casos no tenían la información de seguimiento hasta 5 años. Se encontró que 46 pacientes (57,5%) presentaron BCR, de los cuales, 25 (54,3%) tenían presencia de fusión y 21 (45,7%) hacían parte del grupo con ausencia de fusión, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p=0.332$ (Tabla 6).

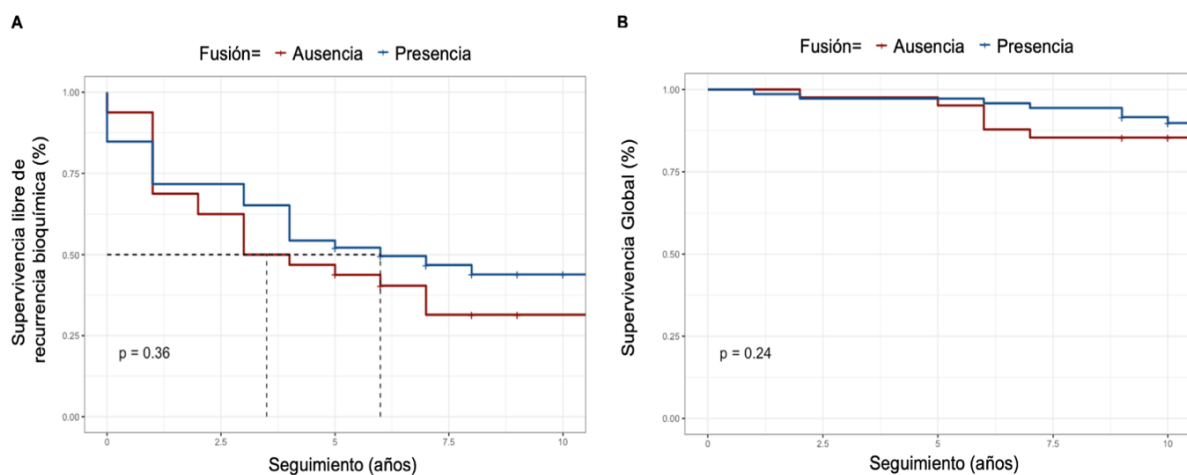


Figura 27. Análisis de supervivencia según el estado de fusión. A. Supervivencia libre de recurrencia bioquímica en pacientes con presencia y ausencia de fusión TMPRSS2-ERG. **B.** Supervivencia global en pacientes con presencia y ausencia de fusión TMPRSS2-ERG.

La mediana del tiempo de supervivencia hasta la recurrencia bioquímica fue menor en pacientes con ausencia de fusión en comparación con pacientes que presentaban la fusión (3,5 años vs 6 años), sin embargo, estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos ($p=0,36$) (Tabla 6 y Figura 27A).

La supervivencia global se analizó en los 112 pacientes, de los cuales 14 (13,2%) fallecieron. El tiempo promedio fue de 12,3 años para el grupo con presencia y de 11,7 años para el grupo con ausencia, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,24$) (Tabla 6 y Figura 27B).

7. Discusión

En Colombia los casos de cáncer de próstata han aumentado con los años convirtiéndolo en el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad del país y por lo tanto en un problema de salud pública en ascenso [3]. Actualmente, se emplean herramientas clínicas y patológicas de tamizaje y diagnóstico como la determinación del PSA y los grados y el puntaje de Gleason, además del estadio clínico y patológico con el fin de brindar una clasificación de los pacientes con esta enfermedad y evaluar el riesgo de recaída bioquímica o clínica posterior a prostatectomía radical o radioterapia [46,47,82,91]. Esta información es utilizada para determinar el pronóstico de los pacientes con CaP, no obstante, ninguna de estas herramientas indica o diferencia de forma certera los casos que van a progresar a tumores más agresivos y que si requieren tratamiento de los casos que serán indolentes. Por esta razón, se ha venido trabajando en subtipos moleculares que permitan mejorar la clasificación de los pacientes con respecto al pronóstico mediante biomarcadores asociados [17,18,20,122].

Diferentes consorcios han evaluado biomarcadores en CaP localizado, uno de ellos el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), el cual, ha logrado establecer siete subtipos moleculares que describen el 74% de los tumores analizados. De estos subtipos, cuatro están caracterizados por genes de fusión específicos de la familia ETS como ERG, ETV1, ETV4 y FLI1, que generalmente se fusionan con TMPRSS2 y se denominan ETS+. Los otros tres subtipos son los genes *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*, los cuales presentan mutaciones y son excluyentes de las fusiones, por lo que se designan como ETS-.

Una de las alteraciones moleculares más conocida derivada de los subtipos ETS+, es la fusión TMPRSS2-ERG, en el presente estudio fueron detectados 71 pacientes (63,4%) con presencia de fusión. La frecuencia de esta alteración varía según la etnicidad, encontrando valores para hombres caucásicos entre 40-66%, asiáticos entre 9-27% y africanos entre

25-31% y el porcentaje encontrado en este estudio fue similar al de población caucásica reportado por Perner y colaboradores donde encontraron presencia de fusión en 35 de 58 muestras (60,3%) o García-Flores y colaboradores en donde determinaron el estado de fusión en 175 de 265 casos (66%). Aunque en nuestro país no existen datos adicionales de análisis de la fusión en CaP por FISH, recientemente ha sido evaluada la sobreexpresión de ERG, la cual presenta una fuerte asociación con el estado de fusión, en 53 focos de 20 pacientes colombianos, encontrando sobreexpresión en el 52,8% de los focos analizados, lo que se relaciona a lo encontrado en este trabajo. La mayoría de los pacientes con fusión presentaron deleciones y translocaciones de ERG y TMRSS2 juntas (80,3%).

La asociación de la fusión con la progresión y pronóstico de la enfermedad ha tenido resultados controversiales en los diferentes estudios. Se ha encontrado la presencia de fusión asociado a un estadio tumoral superior y compromiso de ganglios linfáticos, menor tiempo hasta la recurrencia bioquímica, altos niveles de PSA preoperatorio y supervivencia global menor [21,114,121,122], por otro lado, se ha observado que la ausencia de fusión se asociaba a un puntaje de Gleason mayor y un tiempo menor hasta recurrencia bioquímica [115,120,123]. Algunas investigaciones no han arrojado una asociación específica entre el estado de fusión y el pronóstico de los pacientes [119,124].

En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables clínico-patológicas analizadas. Teniendo en cuenta el esquema de seguimiento que se realiza en el INC posterior a la prostatectomía radical, particularmente, se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de recurrencia bioquímica en donde una gran proporción de pacientes con fusión tuvieron recaída bioquímica entre 1-3 meses (40%), comparados con los pacientes con ausencia de fusión que solamente presentaron BCR en un 4,8% ($p=0,014$). En los análisis de supervivencia libre de recurrencia bioquímica y supervivencia global, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos se correlacionan con estudios en los que no se ha encontrado una asociación del estado de fusión con el pronóstico de la enfermedad, no obstante, no se descarta que la falta de significancia se deba al tamaño de la muestra.

En cuanto a los subtipos ETS-, se han reportado diferentes alteraciones moleculares en *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1*, entre ellas mutaciones por cambio de sentido con pérdida o ganancia de función según sea el caso. La frecuencia de mutaciones también ha sido asociada a la etnicidad o ancestría de los pacientes, en el caso de *SPOP* se ha encontrado un porcentaje de mutación del 20% en pacientes con ancestría africana y entre el 5-14% población europea, asiática y en norteamericanos [6,17,18,44,140], de los cuales, la frecuencia más baja se observa en americanos africanos (5%) [18].

En el caso de *SPOP*, de los 41 casos negativos para la fusión se encontraron dos mutaciones por cambio de sentido con pérdida de función en dos casos independientes (4,9%), si se tienen en cuenta los 112 casos analizados, la mutación se presentó en 1,8% de los pacientes. Las frecuencias reportadas para mutaciones en *SPOP* hacen referencia al análisis del total de las muestras, pero en este estudio solo se analizaron en los pacientes con ausencia de fusión dado el papel excluyente entre estas alteraciones. A pesar de esto, el porcentaje de mutación de *SPOP* encontrado en este estudio, es bajo, a comparación de los estudios realizados en otras poblaciones.

Una de las mutaciones encontradas fue en el exón 6 en 305T>G, generando un cambio en la proteína en F102C de un aminoácido aromático apolar a uno alifático polar. La otra mutación hallada fue en el exón 7 en 399C>G ocasionando un cambio en la proteína en F133L de un aminoácido aromático apolar a uno alifático apolar. Los cambios espaciales, estructurales y de polaridad en los aminoácidos ocasionados por estas mutaciones causan que la afinidad de unión al sustrato disminuya y por lo tanto no pueda darse su debida ubiquitinación y degradación en el proteosoma a nivel celular, esto se debe a que los aminoácidos relacionados hacen parte de la hendidura de unión a sustrato de *SPOP*. En cuanto al desarrollo de CaP, estas mutaciones han sido reportadas previamente en población africana, europea, asiática y norteamericana como oncogénicas y se han encontrado con alta frecuencia en CaP localizado (93 casos), impidiendo la unión de sustratos como proteínas BET, el receptor de andrógenos o el coactivador del receptor de esteroides SRC3, considerados como desencadenantes de progresión tumoral. La baja frecuencia de mutaciones de *SPOP* en nuestra población podría deberse a la variabilidad de frecuencias reportadas dependiendo del tipo de población.

Al analizar múltiples focos de cada paciente, se encontraron estas mutaciones solo en uno de los focos tumorales en cada caso, y no se encontraron mutaciones en los tejidos no tumorales adyacentes, estos resultados resaltan las mutaciones en *SPOP* como un evento de parición tumoral en estos pacientes. No se encontraron mutaciones en el resto de las muestras tumorales a pesar de tener la misma clasificación, por lo que se destaca la multifocalidad descrita en CaP.

Para el caso de *FOXA1*, se han encontrado mutaciones entre el 3-9% en población occidental, siendo 3% lo reportado por el TCGA, sin embargo, un estudio reciente en población asiática encontró una frecuencia de mutación del 41%, lo cual indica que las alteraciones relacionadas a esta proteína pueden depender de la población. Para el caso de población colombiana, se analizaron las mutaciones por cambio de sentido del dominio Forkhead de la proteína que han sido reportadas en CaP, pero no se encontró ninguna mutación en los pacientes del estudio, lo que podría estar asociado al tipo de población.

Por otro lado, no se lograron estandarizar los procedimientos para *IDH1*, debido a que los primers utilizados no fueron adecuados para la amplificación de las muestras FFPE tumorales, por lo tanto, no pudieron ser evaluadas las mutaciones en este subtipo en las muestras de los pacientes del estudio.

Teniendo en cuenta el análisis de los subtipos realizados en estudios previos y los resultados obtenidos en este trabajo, se evidencia una menor frecuencia de los subtipos *SPOP* y *FOXA1*, no se descarta la posibilidad de que los resultados obtenidos se deban al tamaño de la muestra y que estos resultados varíen en diferentes regiones del país con diferentes mezclas étnicas.

Finalmente, hallazgos como estos, muestran que es necesario conocer las diferentes alteraciones moleculares en CaP en nuestra población, ya que los resultados pueden ser variables respecto a otras poblaciones y por lo tanto se puede dar una clasificación de la enfermedad a nivel molecular distinta y de la misma manera, las herramientas de correlación a pronóstico y la elección de tratamiento pueden ser diferentes, por esto, es necesario evaluar nuevas alteraciones en un tamaño de muestra mayor que permitan facilitar y definir una clasificación del CaP en nuestra población.

8. Conclusiones y perspectivas

8.1 Conclusiones

- Los tejidos de prostatectomía radical de pacientes con CaP fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) fueron un material valioso y se logró obtener buenos resultados experimentales para el análisis de las alteraciones moleculares en *SPOP* y *FOXA1* en el presente estudio.
- La frecuencia de fusión del subtipo ERG detectada mediante FISH en nuestra población fue de 63,4%, similar a lo observado para población caucásica norteamericana, en donde fue detectada una frecuencia del 60%. No se encontró asociación entre el estado de fusión y el pronóstico de la enfermedad.
- El subtipo *SPOP* fue encontrado en dos pacientes del grupo con ausencia de fusión (4,9%), observando una mutación por cambio de sentido en el exón 6 (p.F102C - c.305T>G) y otra en el exón 7 (p.F133L - c.399C>G). En el total de los pacientes analizados, hace referencia a un 1,8% de mutación. La baja frecuencia encontrada de este subtipo puede deberse a la variabilidad en el porcentaje de mutación dependiendo del tipo de población (5-20%).
- No se encontraron mutaciones en *FOXA1* en las muestras de los pacientes con CaP analizados.

- No se lograron evaluar las mutaciones en *IDH1*, dado que los primers utilizados no permitieron la amplificación del exón frecuentemente mutado en las muestras FFPE tumorales.

8.2 Perspectivas

A partir de este estudio, se evidencia la importancia del análisis de alteraciones en nuestra población ya que puede arrojar resultados diversos a otras poblaciones, teniendo en cuenta esto, como parte de una nueva investigación, se plantea la evaluación de estos subtipos en diferentes regiones del país analizando el componente de ancestría y su posible asociación con la frecuencia de estas alteraciones, y a su vez observando el impacto que esto pueda tener en el pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud OMS. Cáncer [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 28]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. International Agency for Research on Cancer IARC. Estimated Prostate Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 4]. Available from: <https://www.iarc.fr/>
3. GLOBOCAN. Prostate - Estimated cancer incidence, all ages: both sexes [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 31]. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_pop.html.asp?selection=40170&title=Colombia&sex=0&type=0&window=1&sort=0&submit=Execute
4. Lilja H et al. Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(4):268–78.
5. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol*. 2012;3(2):120–9.
6. Barbieri CE et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2014;44(6):685–9.
7. Chen N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. 2016;28(1):58–64.
8. Epstein JI et al. 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*. 2016;40(2):244–52.
9. Magi-Galluzzi C et al. Contemporary Gleason grading and novel Grade Groups in clinical practice. *Curr Opin Urol*. 2016;26(5):488–92.
10. D'Amico A V. et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *J Am Med Assoc*. 1998;280(11):969–74.
11. Hernandez DJ et al. Contemporary Evaluation of the D'Amico Risk Classification of Prostate Cancer. *Urology*. 2007;70(5):931–5.
12. Schiffmann J et al. Heterogeneity in D'Amico classification-based low-risk prostate cancer: Differences in upgrading and upstaging according to active surveillance eligibility. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Online]. 2015;33(7):329.e13-329.e19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.04.004>

13. Sedarsky J et al. Ethnicity and ERG frequency in prostate cancer. *Nat Publ Gr*. 2017;15(2):125–31.
14. Yoon N et al. SPOP mutation in prostate cancers in Korean population: Variation in its mutation frequency among ethnic groups. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9(3):4123–8.
15. Muruve NA. Prostate Anatomy [Internet]. Medscape. 2017 [cited 2018 Mar 20]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1923122-overview>
16. Yuan J et al. Integrative comparison of the genomic and transcriptomic landscape between prostate cancer patients of predominantly African or European genetic ancestry. *PLoS Genet* [Online]. 2020;16(2):1–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1008641>
17. The Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011–1025.
18. Blattner M et al. SPOP Mutations in Prostate Cancer across Demographically Diverse Patient Cohorts. *Neoplasia* [Online]. 2014;16(1):14–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558614800031>
19. Correa JJ et al. Mechanisms of Carcinogenesis in Prostate Cancer. 2015. 295–302 p.
20. García-Flores M et al. Clinico-pathological significance of the molecular alterations of the SPOP gene in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50(17):2994–3002.
21. Song C, Chen H. Predictive significance of TMRPSS2-ERG fusion in prostate cancer: A meta-analysis. *Cancer Cell Int* [Online]. 2018;18(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0672-2>
22. Humphrey PA et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol* [Online]. 2016;70(1):106–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
23. Sizemore GM et al. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. *Nat Rev Cancer* [Online]. 2017;17(6):337–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.20>
24. An J et al. Destruction of Full-Length Androgen Receptor by Wild-Type SPOP, but Not Prostate-Cancer-Associated Mutants. *Cell Rep* [Online]. 2014;6(4):657–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.013>
25. Shoag J et al. Prognostic value of the SPOP mutant genomic subclass in prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Online]. 2020;000:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.02.011>
26. Geng C et al. SPOP regulates prostate epithelial cell proliferation and promotes ubiquitination and turnover of cMYC oncoprotein. 2018;36(33):4767–77.
27. Yan Y et al. Dual inhibition of AKT-mTOR and AR signaling by targeting HDAC3 in PTEN or SPOP mutated prostate cancer. *EMBO Mol Med*. 2018;10(4):1–20.

28. Zhang P et al. Intrinsic BET inhibitor resistance in SPOP -mutated prostate cancer is mediated by BET protein stabilization and AKT – mTORC1 activation. *Nat Med.* 2017;23(9):1055–62.
29. Zhu H et al. SPOP E3 Ubiquitin Ligase Adaptor Promotes Cellular Senescence by Degrading the SENP7 deSUMOylase. *Cell Rep.* 2015;13(6):1183–93.
30. Marzahn MR et al. Higher-order oligomerization promotes localization of SPOP to liquid nuclear speckles . *EMBO J.* 2016;35(12):1254–75.
31. Zhang J et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Vol. 553, Nature.* 2018. 91–95 p.
32. Hernández-Llodrà S et al. SPOP and FOXA1 mutations are associated with PSA recurrence in ERG wt tumors, and SPOP downregulation with ERG-rearranged prostate cancer. *Prostate.* 2019;79(10):1156–65.
33. Sahu B et al. Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin , androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J.* 2011;30(19):3962–76.
34. Yen KE et al. Cancer-associated IDH mutations: Biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010;29(49):6409–17.
35. Molenaar RJ et al. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene [Online].* 2018;2:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0077-z>
36. Ghiam AF et al. Cancer-Associated IDH1 Promotes Growth and Resistance to Targeted Therapies in the Absence of Mutation. *Cell Rep [Online].* 2012;19(33):3826. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.546>
37. Liu D et al. Impact of the SPOP Mutant Subtype on the Interpretation of Clinical Parameters in Prostate Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2018;(2):1–13.
38. Hu Y et al. Expression and clinical relevance of SPOPL in medulloblastoma. *Oncol Lett.* 2017;14(3):3051–6.
39. Li JJ et al. Decreased expression of speckle-type POZ protein for the prediction of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(3):2743–8.
40. Cheng F et al. The association of speckle-type POZ protein with lymph node metastasis and prognosis in cancer patients: A meta-analysis. *Med (United States).* 2019;98(40).
41. Gerhardt J et al. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer and Represents a Novel Hallmark of Castration-Resistant Prostate Cancer. *AJPA [Online].* 2012;180(2):848–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.021>
42. Tang L et al. NCOR1 may be a potential biomarker of a novel molecular subtype of

- prostate cancer. *FEBS Open Bio*. 2020;0–3.
43. Adams EJ et al. FOXA1 mutations alter pioneering activity, differentiation and prostate cancer phenotypes. *Nature* [Online]. 2019;571(7765):408–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1318-9>
 44. Boysen G et al. SPOP mutation leads to genomic instability in prostate cancer. *Elife*. 2015;4(September):1–4.
 45. Blattner M et al. SPOP Mutation Drives Prostate Tumorigenesis In Vivo through Coordinate Regulation of PI3K/mTOR and AR Signaling. *Cancer Cell* [Online]. 2017;31(3):436–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.004>
 46. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma : current state and prognostic implications. *Diagn Pathol* [Online]. 2016;11(25):2–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-016-0478-2>
 47. Acosta N et al. Biomarcadores de pronóstico en pacientes con cáncer de próstata localizado. *Rev Colomb Cancerol*. 2017;21(2):113–25.
 48. Khani F et al. Evidence for Molecular Differences in Prostate Cancer between African American and Caucasian Men. *Clin Cancer Res*. 2015;20(March 2012):4925–34.
 49. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Online]. 2016 Jun 1 [cited 2018 Mar 1];1863(6):1238–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916300416>
 50. Banerjee PP et al. Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol* [Online]. 2018;6(2):62–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29666834> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5902724>
 51. Durán FR et al. El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática [Internet]. Vol. 2, *Neurobiología Revista Electrónica*. 2011 [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Rojas-et al/HTML.html>
 52. Vickman RE et al. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J Urol* [Online]. 2019;7(3):192–202. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.10.003>
 53. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Cáncer de próstata: Opciones de tratamiento [Internet]. Marzo. 2018. Available from: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-próstata/opciones-de-tratamiento>
 54. UK CR. Types of prostate cancer [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/stages/types>
 55. Society AC. ¿Qué es el cáncer de próstata? [Internet]. Agosto. 2019. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/acerca/que-es-cancer-de-prostata.html>
 56. Ramírez-Balderrama L et al. Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de

- prostate. *Gac Med Mex.* 2013;149(6):639–45.
57. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63–89.
 58. Pardo C et al. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia [Internet]. 2017. 124 p. Available from: https://www.cancer.gov.co/ATLAS_de_Mortalidad_por_cancer_en_Colombia.pdf
 59. Pardo C, Cendales R. Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia, 2007-2011. Instituto Nacional de Cancerología-ESE Colombia. 2011. 1–150 p.
 60. Perdana NR et al. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones.* 2016;48(3):228–38.
 61. Kimura T, Egawa S. Epidemiology of prostate cancer in Asian countries. *Int J Urol.* 2018;25(6):524–31.
 62. Fund WC research. Diet, nutrition, physical activity and prostate cancer. *Nutr Food Sci.* 2014;37(3):41–2.
 63. Niclis C et al. Dietary habits and prostate cancer prevention: A review of observational studies by focusing on south America. *Nutr Cancer.* 2012;64(1):23–33.
 64. Huncharek M et al. Dairy products, dietary calcium and vitamin D intake as risk factors for prostate cancer: A meta-analysis of 26,769 cases from 45 observational studies. *Nutr Cancer.* 2008;60(4):421–41.
 65. Bouvard V et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* [Online]. 2015;16(16):1599–600. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204515004441>
 66. Sierra MS, Forman D. Etiology of prostate cancer (C 61) in Central and South America. *Lyon Int Agency Res Cancer.* 2016;1(1):1–11.
 67. De Marzo AM et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256–69.
 68. Alvarez-Cubero MJ et al. Prognostic role of genetic biomarkers in clinical progression of prostate cancer. *Exp Mol Med* [Online]. 2015;47(8):e176. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2015.43>
 69. De Marzo AM et al. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155(6):1985–92.
 70. Benedetti-Padrón, Reyes N. Atrofia Inflamatoria Proliferativa: Potencial Lesión Precursora De Adenocarcinoma Prostático. *Rev Ciencias Biomédicas.* 2013;5.
 71. National Library of Medicine. PubMed [Internet]. 2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
 72. Aurilio G et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer : From

- Genetics to Clinical Applications. :1–14.
73. Garcia-Perdomo HA et al. Molecular alterations associated with prostate cancer. *Cent Eur J Urol*. 2018;71(2):168–76.
 74. Chuandong et al. Androgen receptor is the key transcriptional mediator of the tumor suppressor *SPOP* in prostate cancer. *Cancer*. 2015;74(19):5631–43.
 75. Larisa N. Evidence for Field Cancerization of the Prostate. 2013;69(13):1470–9.
 76. Sistema General de Seguridad Social en Salud-Colombia I. Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana , seguimiento y rehabilitación del cáncer de próstata. 2013. 1–718 p.
 77. Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología. Manual para la detección temprana del cáncer de próstata [Internet]. Instituto Nacional de Cancerología. 2015. 31–40, 43–61 p. Available from: <http://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/Piel>
 78. Uribe Arcila JF. La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. *Med Lab*. 2008;14(03–04):153–66.
 79. Stephan C et al. Prostate-specific antigen (PSA) screening and new biomarkers for prostate cancer (PCa). *J Int Fed Clin Chem Lab Med*. 2014;25:55–78.
 80. Vigna-Taglianti R et al. Predictive value of Prostate Specific Antigen variations in the last week of salvage radiotherapy for biochemical recurrence of prostate cancer after surgery: A practical approach. *Cancer Rep*. 2020;3(6):1–6.
 81. Algaba F. Actualización de la patología del cáncer de próstata [Internet]. 2016. Available from: <https://www.seap.es/documents/10157/1432467/Algaba+-SEAP+2016.pdf>
 82. Board CNE. Prostate Cancer: Stages and Grades [Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 24]. p. 1. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/stages-and-grades>
 83. American Joint Committee on Cancer AJCC institución. Cancer Staging Manual. 2017.
 84. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Prostate Cancer: Stages and Grades [Internet]. 2018. Available from: <https://www.asco.org/>
 85. Rodrigues G et al. Pre-treatment risk stratification of prostate cancer patients: A critical review. *J Can Urol Assoc*. 2012;6(2):121–7.
 86. Thompson I et al. Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update. *J Urol*. 2007;177(6):2106–31.
 87. Heidenreich A et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2008;53:68–80.
 88. Bourke L et al. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG GUIDELINES. 2018;(March):53–78.

89. Graham J et al. Diagnosis and treatment of prostate cancer: Summary of NICE guidance. *Bmj*. 2008;336(7644):610–2.
90. Various. NICE guideline NG131: Prostate Cancer: Biology, Diagnosis and Management. NICE Guidel. 2019;(May):701.
91. Mohler JL et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(5):479–505.
92. Aslam N, Nadeem K. Prostate Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Abeloff's Clin Oncol 5/e* [Online]. 2015;8(2):938–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00084-9>
93. Freedland MG et al. Clinically Localized Prostate Cancer AUA/ASTRO/SUO Guideline. 2017.
94. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Prostate Cancer: Types of Treatment [Internet]. 2018. Available from: <https://www.cancer.net>
95. Parker C. Treating prostate cancer. *BMJ*. 2012;345(7868):1–67.
96. Laccetti AL et al. A clinical evaluation of enzalutamide in metastatic castration-sensitive prostate cancer: Guiding principles for treatment selection and perspectives on research. *Onco Targets Ther*. 2020;13:13247–63.
97. Paller CJ, Antonarakis ES. Management of biochemically recurrent prostate cancer after local therapy: Evolving standards of care and new directions. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013;11(1):14–23.
98. Li J et al. A genomic and epigenomic atlas of prostate cancer in Asian populations. *Nature*. 2020;580(April):93–9.
99. Sha J et al. Downregulation of circ-TRPS1 suppressed prostatic cancer prognoses by regulating miR-124-3p / EZH2 axis-mediated stemness. *Am J Cancer Res*. 2020;10(12):4372–85.
100. Chen J et al. Long Non-Coding RNA SNHG1 Regulates the Wnt/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways via EZH2 to Affect the Proliferation, Apoptosis, and Autophagy of Prostate Cancer Cell. *Front Oncol*. 2020;10(October):1–12.
101. Kong Y et al. Inhibition of EZH2 Enhances the Antitumor Efficacy of Metformin in Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(12):2490–501.
102. Burkhart DL et al. Evidence that EZH2 Dereglulation is an Actionable Therapeutic Target for Prevention of Prostate Cancer. *Cancer Prev Res*. 2020;13(12):979–88.
103. Zhu J et al. Coexpression analysis of the EZH2 gene using the cancer genome atlas and oncomine databases identifies coexpressed genes involved in biological networks in breast cancer, glioblastoma, and prostate cancer. *Med Sci Monit*. 2020;26:1–12.
104. Koh CM et al. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via

- transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*. 2011;2(9):669–83.
105. Huang KC et al. SPINK1 Overexpression in Localized Prostate Cancer: a Rare Event Inversely Associated with ERG Expression and Exclusive of Homozygous PTEN Deletion. *Pathol Oncol Res* [Online]. 2017;23(2):399–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-016-0119-9>
 106. Stenman UH. Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer. *Eur Urol*. 2012;62(4):733–4.
 107. Kunderfranco P et al. ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One*. 2010;5(5).
 108. Chen H et al. NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res*. 2002;62(2):338–40.
 109. Shen JZ et al. NKX3.1 Identifies Prostatic Origin of Dural Metastasis in the Setting of Negative Prostate-Specific Antigen Stain. *Neurohospitalist*. 2020;10(4):314–7.
 110. Rescigno P et al. Characterizing CDK12-Mutated Prostate Cancers. *Clin Cancer Res*. 2021;27(2):566–74.
 111. Yi-Mi W et al. Inactivation of CDK12 delineates a distinct immunogenic class of advanced prostate cancer. *Cell* [Online]. 2018;8(7):1770–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6084431/pdf/nihms-983138.pdf>
 112. Gan W et al. SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of the ERG Oncoprotein to Suppress Prostate Cancer Progression. *Mol Cell*. 2015;59(6):917–30.
 113. Tomlins SA et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* (80-). 2005;310(5748):644–8.
 114. Perner S et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(17):8337–41.
 115. Magi-Galluzzi C et al. TMPRSS2-ERG gene fusion prevalence and class are significantly different in prostate cancer of Caucasian, African-American and Japanese patients. *Prostate*. 2011;71(5):489–97.
 116. Segura-Moreno Y. Análisis molecular de la multifocalidad en cáncer de próstata com proceso de entendimiento del modelo de carcinogénesis de la enfermedad. 2019;1–87.
 117. Kim SH et al. Overexpression of ERG and wild-type PTEN are associated with favorable clinical prognosis and low biochemical recurrence in prostate cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):1–13.
 118. An J et al. Truncated ERG Oncoproteins from TMPRSS2-ERG Fusions Are Resistant to SPOP-Mediated Proteasome Degradation. *Mol Cell*. 2015;59(6):904–16.

119. Lapointe J et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol.* 2007;20(4):467–73.
120. Attard G et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene.* 2008;27(3):253–63.
121. Saramäki OR et al. TMPRSS2.ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3395–400.
122. Kulda V et al. Prognostic significance of TMPRSS2-ERG fusion gene in prostate cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(9):4787–93.
123. Zhou CK et al. TMPRSS2:ERG gene fusions in prostate cancer of west African men and aMeta-analysis of racial differences. *Am J Epidemiol.* 2017;186(12):1352–61.
124. Chen R et al. Prevalence and clinical application of TMPRSS2-ERG fusion in Asian prostate cancer patients: a large-sample study in Chinese people and a systematic review. *Asian J Androl.* 2019;21(July):1–4.
125. Nagai Y et al. Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. *FEBS Lett [Online].* 1997;418(1–2):23–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01340-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01340-9)
126. NCBI. SPOP speckle type BTB/POZ protein [*Homo sapiens (human)*] [Internet]. 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8405>
127. Errington WJ et al. Adaptor Protein Self-Assembly Drives the Control of a Cullin-RING Ubiquitin Ligase. *Cell.* 2012;3:1141–53.
128. Zhuang M et al. Structures of SPOP-Substrate Complexes: Insights into Molecular Architectures of BTB-Cul3 Ubiquitin Ligases. *Mol Cell.* 2010;36(1):39–50.
129. Zhang P et al. Intrinsic BET inhibitor resistance in SPOP-mutated prostate cancer is mediated by BET protein stabilization and AKT-mTORC1 activation. *Nat Med.* 2017;23(9):1055–62.
130. Jung-Eun K et al. Multiple weak linear motifs enhance recruitment and processivity in SPOP-mediated substrate ubiquitination. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
131. Blattner M et al. SPOP Mutation Drives Prostate Tumorigenesis In Vivo through Coordinate Regulation of PI3K/mTOR and AR Signaling Article SPOP Mutation Drives Prostate Tumorigenesis In Vivo through Coordinate Regulation of PI3K / mTOR and AR Signaling. *Cancer Cell.* 2017;31(3):436–51.
132. Wu F et al. Prostate cancer-associated mutation in SPOP impairs its ability to target Cdc20 for poly-ubiquitination and degradation. 2018;207–14.
133. Gallo M Le et al. Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. 2013;44(12):1310–5.
134. Zhang P et al. Endometrial cancer-associated mutants of SPOP are defective in

- regulating estrogen receptor- α protein turnover. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1687.
135. Montero-Ovalle W; Sanabria-Salas C; Serrano-López ML. Speckle type poz adaptor protein (SPOP) and its role in cancer. *Rev Colomb Cancerol.* 2020;25(3).
 136. Bouchard JJ et al. Cancer Mutations of the Tumor Suppressor SPOP Disrupt the Formation of Active, Phase-Separated Compartments. *Mol Cell [Online].* 2018;72(1):19-36.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.027>
 138. Cuneo MJ, Mittag T. The ubiquitin ligase adaptor SPOP in cancer. *FEBS J.* 2019;286(20):3946–58.
 139. Ciulli EB and A. Targeting Cullin–RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation. *Biochem J.* 2015;386:365–86.
 140. Bulatov E, Ciulli A. Targeting Cullin–RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation. *Biochem J [Online].* 2015;467(3):365–86. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20141450>
 141. Ma J et al. SPOP promotes ATF2 ubiquitination and degradation to suppress prostate cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):1–13.
 142. Kim B et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex. *Biochem Biophys Res Commun [Online].* 2011;415(4):720–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.154>
 143. Tan P et al. SPOP suppresses pancreatic cancer progression by promoting the degradation of NANOG. *Cell Death Dis.* 2019;10(11).
 144. Theurillat JP et al. Ubiquitylome analysis identifies dysregulation of effector substrates in SPOP-mutant prostate cancer. 2014;346(6205):85–9.
 145. Wang X et al. AMPK Promotes SPOP-Mediated NANOG Degradation to Regulate Prostate Cancer Cell Stemness. *Dev Cell [Online].* 2019;48(3):345-360.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.033>
 146. Zeng C et al. SPOP suppresses tumorigenesis by regulating Hedgehog/Gli2 signaling pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):1–12.
 147. Janouskova H et al. Opposing effects of cancer-Type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. *Nat Med [Online].* 2017;23(9):1046–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4372>
 148. Papers JB et al. BTB Domain-containing Speckle-type POZ Protein (SPOP) Serves as an Adaptor of Daxx for Ubiquitination by Cul3-based Ubiquitin Ligase. 2006;281(18):12664–72.
 149. Zhu K et al. SPOP-containing complex regulates SETD2 stability and H3K36me3-coupled alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(1):92–105.
 150. Jin X et al. Dysregulation of INF2-mediated mitochondrial fission in SPOP-mutated prostate cancer. *PLoS Genet.* 2017;13(4):1–24.

151. Mahmud I, Liao D. DAXX in cancer: phenomena, processes, mechanisms and regulation. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):7734–52.
152. Luo J et al. SPOP promotes FADD degradation and inhibits NF- κ B activity in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* [Online]. 2018;504(1):289–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.176>
153. Raina K et al. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(26):7124–9.
154. Yan Y et al. The novel BET-CBP/p300 dual inhibitor NEO2734 is active in SPOP mutant and wild-type prostate cancer. *EMBO Mol Med.* 2019;11(11):1–19.
155. Wang F et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 suppresses the proliferation of gastric cancer cells and the tumorigenicity of cancer stem cells through regulating SPOP. *J Cell Mol Med.* 2020;(August 2019):1–9.
156. Fong K wing et al. TRIM28 protects TRIM24 from SPOP-mediated degradation and promotes prostate cancer progression. *Nat Commun* [Online]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07475-5>
157. Groner AC et al. TRIM24 is an oncogenic transcriptional activator in prostate cancer. 2017;29(6):846–58.
158. Gao K et al. Tumor suppressor SPOP mediates the proteasomal degradation of progesterone receptors (PRs) in breast cancer cells. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):3210–20.
159. Dai X et al. Prostate cancer – associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of. *Nat Publ Gr* [Online]. 2017;23(9):1063–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4378>
160. An J et al. Truncated ERG Oncoproteins from TMPRSS2-ERG Fusions Are Resistant to SPOP-Mediated Proteasome Degradation. *Mol Cell* [Online]. 2015;59(6):904–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.025>
161. Gan W et al. SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of the ERG Oncoprotein to Suppress Prostate Cancer Progression. *Mol Cell* [Online]. 2015;59(6):917–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.026>
162. Coquenlorge S et al. GLI2 Modulated by SUFU and SPOP Induces Intestinal Stem Cell Niche Signals in Development and Tumorigenesis. *Cell Rep* [Online]. 2019;27(10):3006-3018.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.016>
163. Jin X et al. SPOP targets oncogenic protein ZBTB3 for destruction to suppress endometrial cancer. 2019;9(12):2797–812.
164. Yuan LJ et al. SPOP suppresses prostate cancer through regulation of CYCLIN E1 stability. *Cell Death Differ* [Online]. 2019;1156–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0198-0>

165. Shi Q et al. Prostate Cancer-associated SPOP mutations enhance cancer cell survival and docetaxel resistance by upregulating Caprin1-dependent stress granule assembly. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–14.
166. Lund AH et al. Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3-SPOP ubiquitin E3 ligase. 2005;102(21):7635–40.
167. Luo J et al. SPOP promotes SIRT2 degradation and suppresses non-small cell lung cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* [Online]. 2017;483(2):880–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.027>
168. Claiborn KC et al. Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic β cell function and survival in mice. 2010;120(10):3713–21.
169. Bawa-Khalfe T et al. Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17466–71.
170. Ostertag MS et al. The Structure of the SPOP-Pdx1 Interface Reveals Insights into the Phosphorylation-Dependent Binding Regulation. *Struct Des* [Online]. 2019;27(2):327-334.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.005>
171. Pathogens S. Tumor Suppressor Role for the SPOP Ubiquitin Ligase in Signal-Dependent Proteolysis of the Oncogenic Coactivator SRC-3/ AIB1. 2016;1848(42):3047–54.
172. Torres-Arzayus MI et al. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(3):263–74.
173. Dai X et al. Prostate cancer-Associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4. *Nat Med* [Online]. 2017;23(9):1063–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4378>
174. Jeffrey R. Wozniak, Edward P. Riley MEC. SPOP Promotes Nanog Destruction to Suppress Stem Cell Traits and Prostate Cancer Progression. *Physiol Behav*. 2019;176(1):139–48.
175. Zhi X et al. Silencing speckle-type POZ protein by promoter hypermethylation decreases cell apoptosis through upregulating hedgehog signaling pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis* [Online]. 2016;7(12):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.435>
176. Zhu H et al. SPOP E3 Ubiquitin Ligase Adaptor Promotes Cellular Senescence by Degrading the SENP7 deSUMOylase. *Cell Rep* [Online]. 2015;13(6):1183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.083>
177. Ji P et al. Speckle-type POZ protein suppresses hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via ubiquitin-dependent proteolysis of SUMO1/sentrin specific peptidase 7. *Biochem Biophys Res Commun* [Online]. 2018;502(1):30–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.115>

178. Zhang D et al. Speckle-type POZ protein, SPOP, is involved in the DNA damage response. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1691–7.
179. Dong Y et al. SPOP regulates the DNA damage response and lung adenocarcinoma cell response to radiation. *Am J Cancer Res* [Online]. 2019;9(7):1469–83. Available from: www.ajcr.us/
180. Hjorth-Jensen K et al. SPOP promotes transcriptional expression of DNA repair and replication factors to prevent replication stress and genomic instability. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(18):9484–95.
181. Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSK), Princess Margaret Cancer Centre in Toronto, Children’s Hospital of Philadelphia TH in the N and BU in A. cBioPortal for Cancer Genomics [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cbioportal.org/>
182. Catalogue of Somatic Mutation in Cancer COSMIC. SPOP Gene [Internet]. 2020 [cited 2018 Mar 10]. Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=bp%3AAA&wgs=off&id=6661&ln=SPOP&start=1&end=375>
183. Li G et al. SPOP Promotes Tumorigenesis by Acting as a Key Regulatory Hub in Kidney Cancer. *Cancer Cell* [Online]. 2014;25(4):455–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.007>
184. Wang L et al. SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of LATS1 to Enhance Kidney Cancer Progression. *EBioMedicine* [Online]. 2020;56:102795. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102795>
185. Zhao W et al. SPOP promotes tumor progression via activation of catenin/ TCF4 complex in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2016;49(3):1001–8.
186. Harb OA et al. SPOP, ZEB-1 and E-cadherin expression in clear cell renal cell carcinoma (cc-RCC): Clinicopathological and prognostic significance. *Pathophysiology* [Online]. 2018;25(4):335–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.05.004>
187. Ostertag MS et al. Structural Insights into BET Client Recognition of Endometrial and Prostate Cancer-Associated SPOP Mutants. *J Mol Biol* [Online]. 2019;431(11):2213–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.017>
188. Lythgoe C et al. Identification of a novel germline SPOP mutation in a family with hereditary prostate cancer. *Prostate Cancer Sci Clin Pract Second Ed*. 2016;74(9):141–7.
189. Zhuang M et al. Structures of SPOP-Substrate Complexes: Insights into Molecular Architectures of BTB-Cul3 Ubiquitin Ligases. 2010;36(1):39–50.
190. Riisnaes R et al. SPOP-Mutated/CHD1-Deleted Lethal Prostate Cancer and Abiraterone Sensitivity. *Clin Cancer Res*. 2019;24(22):5585–93.
191. Cramer LR y S. SPOP the mutation. *Elife*. 2015;4:e11760:1–4.

192. Shenoy TR et al. CHD1 loss sensitizes prostate cancer to DNA damaging therapy by promoting error-prone double-strand break repair. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28(7):1495–507.
193. Bezawy R et al. SPOP deregulation improves the radiation response of prostate cancer models by impairing DNA damage repair. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1–15.
194. Watanabe R et al. SPOP is essential for DNA-protein cross-link repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex. *Mol Biol Cell*. 2020;31(6):478–90.
195. Jiao C et al. TGF- β signaling regulates SPOP expression and promotes prostate cancer cell stemness. 2020;12:1–14.
196. Xu J et al. Properties and Clinical Relevance of Speckle-Type POZ Protein in Human Colorectal Cancer. *J Gastrointest Surg*. 2015;19(8):1484–96.
197. Zhang S et al. Speckle-Type POZ Protein Down-Regulates Matrix Metalloproteinase 2 Expression via Sp1/PI3K/Akt Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci* [Online]. 2017;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4884-4>
198. Salami J et al. Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Commun Biol* [Online]. 2018;1(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0105-8>
199. Han X et al. Discovery of ARD-69 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradator of Androgen Receptor (AR) for the Treatment of Prostate Cancer. *J Med Chem*. 2019;62(2):941–64.
200. Neklesa TK et al. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol Ther* [Online]. 2017;174:138–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.027>
201. NCBI. FOXA1 forkhead box A1 [Homo sapiens (human)] [Internet]. 21 feb 2021. 2021 [cited 2021 Feb 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3169>
202. Ghajar CM. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. 2012;32(2):1–2.
203. Clark KL et al. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*. 1993;364(6436):412–20.
204. Wang LL et al. The transcription factor FOXA1 induces epithelial ovarian cancer tumorigenesis and progression. *Tumor Biol*. 2017;39(5):1–7.
205. Shah N, Brown M. The Sly Oncogene: FOXA1 Mutations in Prostate Cancer. *Cancer Cell* [Online]. 2019;36(2):119–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.005>
206. Teng M, Cai C. Pioneer of prostate cancer: past, present and the future of FOXA1. *Protein Cell* [Online]. 2021;12(1):29–38. Available from:

- <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00786-8>
207. Gao S et al. Chromatin binding of FOXA1 is promoted by LSD1-mediated demethylation in prostate cancer. *Nat Genet* [Online]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-020-0681-7>
 208. Pomerantz MM et al. Prostate cancer reactivates developmental epigenomic programs during metastatic progression. *Nat Genet*. 2020;52:790–799.
 209. Hirotsu C et al. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Sci*. 2015;8(3):143–52.
 210. Kim J et al. FOXA1 inhibits prostate cancer neuroendocrine differentiation. *Oncogene*. 2017;36(28):4072–80.
 211. Imamura Y et al. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer via the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 Pathway. *PlosOne*. 2012;7(8):1–14.
 212. Hong-Jian J et al. Cooperativity and Equilibrium with FOXA1 Define the Androgen Receptor Transcriptional Program. *Nat Commun*. 2014;5:39–72.
 213. Yang Y, Yu J. Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer. *Genes Dis* [Online]. 2015;2(2):144–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2015.01.003>
 214. To L, Editor THE. Altered chromatin recruitment by FOXA1 mutations promotes androgen independence and prostate cancer progression. *Cell Res*. 2019;29:773–5.
 215. To L, Editor THE. Forkhead domain mutations in FOXA1 drive prostate cancer progression. *Nature*. 2019;29:770–772.
 216. Parolia A et al. Distinct structural classes of activating FOXA1 alterations in advanced prostate cancer. *Nature* [Online]. 2019;571(7765):413–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31243372/>
 217. Badve RK et al. High-level expression of forkhead-box protein A1 in metastatic prostate cancer. *Histopathology* [Online]. 2011;58(5):766–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2559.2011.03796.x>
 218. Dang C V et al. Drugging the ‘undruggable’ cancer targets. *Nat Rev Cancer* [Online]. 2017;17:502–508. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.36>
 219. National Center for Biotechnology Information NCBI. IDH1 isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1 [Homo sapiens (human)] [Internet]. Abril. 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3417>
 220. Xu X et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem* [Online]. 2004;279(32):33946–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404298200>
 221. Xu H et al. Androgen receptor reverses the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate-

- induced prostate cancer cell invasion via suppressing the circRNA-51217/miRNA-646/TGF β 1/p-Smad2/3 signaling. *Cancer Lett* [Online]. 2019;472:151–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.014>
222. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations : Mechanisms , Models , and Clinical Opportunities. *Cancer Discov*. 2013;3(7):730–42.
223. Ghiam AF et al. IDH mutation status in prostate cancer. *Oncogene* [Online]. 2012;31(33):3826. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.546>
224. Gonthier K et al. Reprogramming of Isocitrate Dehydrogenases Expression and Activity by the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Mol cancer Res*. 2019;17(8):1699–710.
225. Armenia J et al. The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* [Online]. 2018; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41588-018-0078-z>
226. Hinsch A et al. Immunohistochemically detected IDH1 R132H mutation is rare and mostly heterogeneous in prostate cancer. *World J Urol* [Online]. 2018;36(6):877–882. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00345-018-2225-7>
227. Ricaurte O et al. Estudio de mutaciones en los genes IDH 1 y 2 en una muestra de gliomas en población colombiana. *Biomedica*. 2018;38:1–22.