



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**"IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES GENOMICOS DE DETECCION TEMPRANA EN
CANCER DE PROSTATA MEDIANTE SECUENCIACION DEL EXOMA"**

TÉSIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN UROLOGIA

PRESENTA:

DR. PASCUAL ARMANDO CORTES RAYGOZA

ASESOR:

DR. CARLOS PACHECO GAHLER

**JEFE DE SERVICIO A LA DIVISIÓN DE UROLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL "DR.
MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA

**INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS "D" DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGIA**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

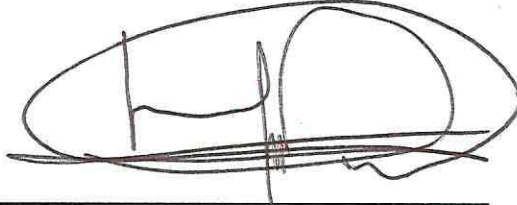
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

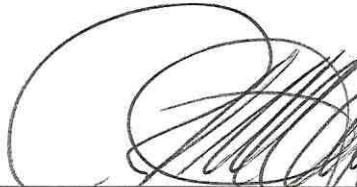
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

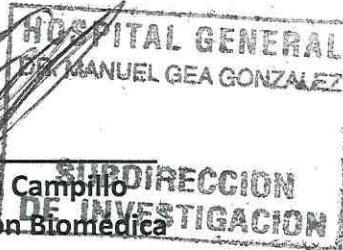
AUTORIZACIONES



Dr. Héctor Manuel Prado Calleros
Director de Enseñanza e Investigación



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Jefe de la división de Urología
Investigador Principal

Este trabajo de tesis con número de registro: 28-130-2018 presentado por Dr. Pascual Armando Cortes Raygoza y se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis Dr. Carlos Pacheco Gahbler con fecha 28/07/19 para su impresión final.



Dr. José Pablo Maravilla Campillo
Subdirector de Investigación Biomédica



Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Investigador Principal

“IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES GENOMICOS DE DETECCION TEMPRANA EN CANCER DE PROSTATA MEDIANTE SECUENCIACION DEL EXOMA”

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en la División de Urología bajo la dirección de Dr. Diddier Giovanni Prada Ortega con el apoyo de Dr. Carlos Pacheco Gahbler y adscritos de la División quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.

COLABORADORES:



Dr. Giovanni Prada Ortega
Investigador Principal



Dr. Carlos Pacheco Gahbler
Investigador Principal

Resumen

Palabras clave: cáncer; próstata; Biomarcadores; secuenciación; biopsia

INTRODUCCION

El Cáncer de próstata (CP) es un problema de salud pública en México. Las herramientas actuales para el diagnóstico de cáncer de próstata son muy imprecisas y no dan una visión panorámica de la enfermedad. La utilización de biopsia líquida en el cáncer de próstata ayudara a llegar a diagnósticos más certeros, y con la posibilidad de saber exactamente que pacientes serán resistentes al tratamiento. Intentaremos encontrar dichos biomarcadores que puedan ser capaces de localizar, diagnósticas y ayudar en el tratamiento de cáncer de próstata.

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron 197 pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González y los del INCan que acudan al Departamento de Urología en el periodo de mayo 2018 a mayo 2020. Pacientes con síntomas obstructivos prostáticos y con APE elevado (.4ng/ml). Se le realizará muestra de sangre y orina, y en su caso de ser positivos a cáncer de prostata se tomará también tejido de biopsia prostático. Se realizo fenotipicacion de los pacientes y se metieron las variables en una base de datos nacional.

Para la validación de datos se usó IBM SPSS versión 25, donde se realiza estadística descriptiva de ambas bases de datos, validación de medias con t de student y graficas de Pearson, así como validación con chi cuadrada con intervalos de confianza del 95%

RESULTADOS

Esta tesis es parte de un protocolo mas extenso el cual por su naturaleza se realizo un corte previo donde se analizaron ambas muestras de pacientes. El protocolo aun continua en espera de los resultados genéticos que demuestren la utilidad de la prueba.

Se obtuvieron un total de 197 muestras de los cuales pacientes sin enfermedad neoplásica fueron 62 (31.5%) y pacientes con enfermedad prostática fueron 135 (68.5%) (Grafico 1). Se obtuvo una media de edad de 67.64(DE=8.33) de pacientes con enfermedad neoplásica y 69.70 (DE=9.58), se presentó un promedio de escolaridad de 7.45(DE=4.8) en el brazo con CP y de 6.67(DE=5.786). No se relacionó el tabaquismo con 24 pacientes (38%) en el grupo sin neoplasia y de 57 individuos (42%) en el paciente con neoplasia con una p de .642. La frecuencia de comorbilidades fue Hipertensión arterial de 36% en el brazo sin neoplasia y de 28% en el brazo con neoplasia. Diabetes mellitus de 56% en el brazo sin neoplasia y de 35% en el brazo sin neoplasia. Se encontró un índice de masa corporal (IMC) de 27.28 (DE=3.65) en el brazo sin neoplasia y de 25.79 (DE=3.35). Se encontraron P significativas en diabetes, IMC y en APE inicial, con 0.011, .005 y de .054 respectivamente. Se realizo un análisis del APE la cual es una variable controlada dentro del estudio por tener grupo sin neoplasia. Se demostró la efectividad de ambos grupos con un APE inicial en el grupo sin neoplasia con una media de 2.38 (DE=2.86), y una media del grupo con neoplasia con una media de 251.07 (DE=1009.75) con un valor de p de 0.54.

DISCUSION

Los resultados obtenidos son preliminares y están en amplia relación a lo ya estudiado en pacientes con CP, encontrando que el IMC y la diabetes están correlacionados con el diagnostico de cáncer de prostata. La obtención de estos resultados es preliminar y están acorde a lo que se busca como objetivo en nuestras bases de datos. los resultados en base a una biopsia liquidan nos darán más información para obtener un diagnostico mas preciso y certero del CP y conocer mas del pronostico de la enfermedad individual del paciente.

“IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES GENOMICOS DE DETECCION TEMPRANA EN CANCER DE PROSTATA MEDIANTE SECUENCIACION DEL EXOMA”

INTRODUCCION

El cáncer de próstata (CP) hace referencia a la proliferación anormal de las células de la glándula prostática¹. Aunque inicialmente la proliferación de las células del cáncer de próstata se mantiene en el órgano de origen, estas pueden alcanzar otros tejidos, principalmente los huesos y los ganglios linfáticos². En etapas iniciales de la enfermedad, el individuo afectado no presenta síntomas. La progresión del CP conlleva a la invasión de tejidos adyacentes y distantes, con elevada morbilidad y posteriormente a la muerte del individuo³.

Dentro de los factores asociados a la presentación de cáncer de próstata se encuentran la edad avanzada, la presencia de antecedentes familiares de CP y la etnicidad, entre otras⁴. La gran mayoría de los casos de CP ocurren en individuos mayores de 50 años. Así mismo, el tener un familiar de primer grado con la enfermedad, aumenta el riesgo de dos a tres veces⁵. Algunos otros factores que se han relacionado con el CP incluyen una dieta rica en carnes procesadas, carnes rojas, productos lácteos o dietas bajas en ciertos vegetales⁶.

De acuerdo con estimaciones de Cancer Today (International Agency for Cancer Research /World Health Organization), el CP es la segunda neoplasia más común en hombres, con alrededor de 782,600 eventos nuevos reportados anualmente de forma global solo para Estados Unidos, la American Cancer Society estimó que se presentarían en el año 2017 alrededor de 161,360 casos nuevos de CP con 27,730 muertes por esta enfermedad^{7,8}. En México y América Central, el CP ocupa el segundo lugar en incidencia de cáncer y el cuarto lugar en mortalidad por cáncer⁹.

De acuerdo con los datos de la Unión Europea, el costo anual de CP es cercano a los \$4.84 mil millones de dólares (5.43 mil millones de euros)¹⁰. En los Estados Unidos, el costo total estimado anual es cercano a los \$ 10 mil millones de dólares (\$9.86 mil millones de dólares para el año 2010). El costo anual por paciente en Estados Unidos es de alrededor de \$10,000 dólares en las etapas iniciales posteriores al diagnóstico y superan los \$33,000 dólares en el último año de la vida, lo que constituye un gran impacto económico, tanto para los pacientes como para los sistemas de salud¹¹.

En general, existe una tendencia mundial hacia una disminución en la incidencia y la mortalidad en CP, lo cual se atribuye al mejoramiento en el tamizaje y en el diagnóstico, por procedimientos quirúrgicos más tempranos y por la introducción de mejores agentes antineoplásicos^{12,13,14}.

Los síntomas más frecuentes relacionados son: fatiga, síntomas urinarios, función sexual y dolor oseo. En menor frecuencia se puede presentar como dificultad para el sueño, adormecimiento de extremidades, pérdida de peso o sangrado. Desafortunadamente los síntomas no son específicos y se pueden atribuir a otras patologías, aunque la presencia o cambios de estos síntomas pueden indicar progresión de la enfermedad¹³.

La búsqueda activa de poblaciones asintomáticas como en aquellos de alto riesgo ofrece la oportunidad de detectar el cáncer de forma temprana y aumenta las posibilidades de un tratamiento exitoso o con intenciones

curativas. Por lo tanto, disminuye la morbilidad, mejora la supervivencia y, en algunos casos, limita el tratamiento a la extracción del tumor, sin la exposición sistémica a los agentes de quimioterapia¹⁵.

En CP, la detección está basada en los síntomas, los hallazgos clínicos (**tacto rectal**) y en el **antígeno prostático específico (APE)**. El APE (también llamado PSA, Calicreina-3, LKL3) es una glicoproteína secretada por las células epiteliales de la glándula prostática y se eleva tanto en procesos neoplásicos de la próstata como en hipertrofia y prostatitis, por lo que su aumento no es indicativo de CP (el valor predictivo positivo del APE es tan solo del 30%). De hecho, la gran mayoría de los pacientes con pruebas positivas (APE >4.0 ng/ml) no presentan CP^{16,17}.

En CP, el APE tampoco es suficientemente sensible en etapa pre-metastásica, donde la enfermedad pudiera ser curable. De hecho, en cáncer de próstata, los beneficios de la detección temprana mediante el APE son marginales cuando se sopesan contra el riesgo potencial de las intervenciones terapéuticas en poblaciones particulares¹⁸.

Basado en estos hechos a partir del año 2012, la United States Preventive Services Task Force (USPSTF, 2012) recomendó no usar el APE para la detección temprana del CP¹⁹. Por lo tanto, es urgente buscar nuevos biomarcadores de detección, especialmente aquellos que permitan reconocer la biología tumoral y las características de la neoplasia subyacente. Su descubrimiento ofrecerá grandes oportunidades para el progreso en relación con la detección y al tratamiento temprano de aquellos casos que involucren una elevada morbilidad y mortalidad en CP²⁰.

La National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ha incorporado un esquema de estratificación que usa el **tacto rectal clínico**, resultado de **Gleason** y **APE**. Estos grupos de riesgo se han utilizado para seleccionar las opciones apropiadas que deben de ser consideradas y para predecir la probabilidad de falla bioquímica posterior a la terapia local definitiva. Los diferentes riesgos incluyen muy bajo riesgo, bajo riesgo, intermedio favorable, intermedio no favorable, alto, muy alto y metastásico²⁰.

Los diferentes tipos de tratamiento en el diagnóstico de CP están relacionados sobre todo a la estadificación de riesgo del paciente, edad y pronóstico de vida. Normalmente se han usado varios tipos de modalidad de tratamiento, entre ellos se encuentra la observación, observación activa, prostatectomía radical con o sin linfadenectomía, radioterapia como tratamiento local, radioterapia para metástasis distal, terapia de privación de andrógenos, quimioterapia o inmunoterapia, braquiterapia. El tratamiento se basa según las recomendaciones de la NCCN, las Guías del centro nacional de excelencia tecnológica en salud (CENETEC) de la Secretaría de Salud y las guías de la European Association of Urology (EAU)²⁰.

La observación incluye el monitoreo del curso del cáncer con la expectativa de dar terapia paliativa en caso del desarrollo de síntomas. El objetivo es mantener la calidad de vida al evitar un tratamiento no-curativo cuando el cáncer de próstata es probable que no sea la causa de mortalidad o morbilidad significativa. Esta es aplicable a hombres de edad avanzada los cuales tienen una expectativa de vida reducida. El monitoreo debe de incluir antígeno y tacto rectal cada 6 meses²⁰.

La observación activa está dirigida a hombres jóvenes con un aparente cáncer indolente con el objetivo de diferir el tratamiento con sus probables efectos secundarios. Los criterios clínicos para predecir un cáncer insignificante son: una etapa clínica T1c, un resultado de biopsia en Gleason ≤6, la presencia de cáncer en

menos de 3 cilindros y menos de 50% en ellos. El seguimiento de los pacientes se debe de realizar con APE y tacto rectal, cada 6 meses, así como una biopsia por saturación al año posterior al diagnóstico²⁰.

La **cirugía** radical como la prostatectomía radical con o sin linfadenectomía, es apropiada para pacientes los cuales tienen el cáncer localizado directamente al CP, con una expectativa de 10 años o más. En caso de la linfadenectomía, se encuentra reservada a pacientes que presentan una probabilidad de metástasis ganglionares del 2% ²⁰.

La radioterapia ha evolucionado para permitir mayores dosis de radiación de manera segura. Las diferentes modalidades a las que está dirigido son: enfermedad temprana, en pacientes con alto riesgo o muy alto riesgo, pacientes con ganglios positivos, o pacientes con metástasis con radioterapia dirigida a los implantes²⁰.

La braquiterapia está enfocada en pacientes de bajo riesgo, ya que se ha encontrado menos efectiva que la radioterapia, en casos de alto riesgo. Este tipo de terapia consiste en la aplicación de semillas radioactivas directamente en el tejido prostático²⁰.

El bloqueo androgénico es utilizado como terapia sistémica primaria en la terapia avanzada, como terapia neoadyuvante concomitante, adyuvante en combinación con la radiación en CP localmente avanzados o localizados. El bloqueo androgénico incluye la castración quirúrgica (orquiectomía radical), liberadores de gonadotropinas (GNRH) ya sea agonistas o antagonistas²⁰.

La **quimioterapia** se ha expandido para ofrecer opciones terapéuticas en los pacientes metastásicos dependiendo de la presencia o ausencia de síntomas. Algunos tipos de quimioterapia usados principalmente ha sido Docetaxel, cabazitaxel, Sipuleucel-T²⁰.

La biopsia líquida en cáncer consiste en la obtención de biomarcadores de cáncer en sangre periférica, a través de la detección de células tumorales circulantes, vesículas extracelulares, así como de DNA circulante tumoral (ctDNA) complementarias como biomarcadores de detección temprana, de diagnóstico de pronóstico y de respuesta al tratamiento en cáncer²⁰.

El **ctDNA** contiene las mismas alteraciones somáticas que ocurren en los tumores malignos, con el beneficio de que puede llegar a ser captado en el torrente sanguíneo y en otros fluidos corporales²¹. El ctDNA ha demostrado tener significancia pronóstica en muchos tipos de cáncer, especialmente cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados y para determinar el estadio clínico de la enfermedad en cáncer^{22,23}. También se ha documentado que cambios en el ctDNA durante la terapia pueden ser un indicador temprano de respuesta a la terapia^{24,25}. En este mismo contexto, el ctDNA puede contener mutaciones del tumor que ocurren durante la presión selectiva de las terapias usadas en cáncer²². Estudios recientes en cáncer colorrectal y en mama han sugerido que la detección de ctDNA después de la terapia para enfermedad temprana, tiene grandes implicaciones pronósticas^{26,27}.

La detección de variaciones en nucleótidos sencillos [VNSs] y en el número de copias [VNCs] en cáncer mediante secuenciación de exones del ctDNA hace referencia a la secuenciación de todos los genes que se encuentran presentes, en este caso, en el genoma humano (**exoma**). Un exoma contiene información de alrededor de 220,000 exones (23,000 genes y cerca de 30 millones de pares de bases) es decir, el 1% del genoma²⁹. Tiene importancia porque corresponde al genoma "funcional" desde el punto de vista fenotípico y porque es mucho más barata que la secuenciación del genoma completo³⁰. El análisis del ctDNA mediante

secuenciación de exones permite detectar tanto VNSs, como VNCs sin un costo o procedimientos de laboratorio adicionales¹⁴.

Asimismo, las VNSs y las VNCs se han asociado al desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer, incluyendo resistencia a quimioterapia³². Los efectos patológicos de los VNCs se han asociado a cambios en la dosis génica y por ende en la expresión de los genes. Por lo tanto, la detección de VNSs y VNCs en el ctDNA de pacientes con CP mediante secuenciación de exones constituye una opción costo/efecto para encontrar biomarcadores, especialmente de detección en CP³³.

Múltiples genes se han investigado para determinar si un CP metastásico tiene potencial agresivo o no, o si un fármaco puede ser resistente a determinado tratamiento. Dentro de las investigaciones han encontrado múltiples alteraciones genómicas en *TMPRSS2-ETS*, *TP53*, *AR*, *PTEN*, *PIK3CA*, *RB1*, *APC*, *CHD1*, *MYC*, *BRCA2*, *ATM*, *ERG*, *SPOP*, *ZBTB16/PLZF*, y en regiones del cromosoma 8q, o pérdida completa de la región 8p^{34,35}.

El beneficio de la biopsia líquida y toma de VNSs y VNCs van a ayudar a la toma de decisiones y pueden ser incluidos como estudios iniciales en el abordaje del CP. El APE, aunque ha tenido demasiada utilidad, se queda corto en algunos casos y no es posible determinar a ciencia cierta con sus valores, el grado o el pronóstico que tendrá un paciente³⁷.

Implementando un tipo de biopsia líquida ayudará en la diferenciación de los pacientes con cáncer indolente, en cuales se tendrá beneficio con la biopsia prostática y se conocerá que pacientes serán resistentes a determinado tratamiento en caso de ser un CP de alto grado³⁸.

Planteamiento del problema

¿Cuáles serán los biomarcadores genómicos de detección temprana en cáncer de próstata mediante secuenciación del exoma?

Justificación

El CP es un problema de salud pública, tanto en México como en el mundo, especialmente en sociedades con un número cada vez mayor de adultos mayores. Su diagnóstico ha implicado un reto, ya que utilizan biomarcadores que son imprecisos en el diagnóstico del CP y puede ser que nos obligue a realizar procedimientos invasivos que no necesite el paciente.

La biopsia líquida, además de los nuevos biomarcadores genómicos han mostrado otra alternativa donde se pudiera, en conjunto con el APE, llegar a diagnósticos más certeros que ameriten o no un procedimiento radical. De esta forma la terapia con medicamentos pueda ser dirigida dependiendo del nivel de mutación en los genes para así mejorar la sobrevida al paciente

La búsqueda de biomarcadores genómicos (VNSs y VNCs) en ctDNA mediante tecnologías de punta como la secuenciación de exomas y la posterior validación por PCR digital en un número elevado de casos, tiene el potencial de contribuir en la detección del CP y de entender las características biológicas del tumor subyacente mediante métodos no invasivos.

Queremos encontrar biomarcadores que sean capaces de localizar, diagnosticar y ayudar en el tratamiento del CP, y si es posible que sea agregada a las guías de tratamiento clínico de la sociedad americana de urología, guías de la norma oficial mexicana, o guías de la sociedad europea de urología.

Godall et al., (2017), llevaron a cabo secuenciación de exomas del ctDNA en pacientes con CP durante el tratamiento y la progresión de la enfermedad, encontrando que podían detectar una disminución de las mutaciones somáticas de estos genes en pacientes respondedores a olaparib, con la reversión de las mutaciones de los genes de reparación del DNA (*BRCA2* y *PALB2*). Con esto, proporcionaron pruebas contundentes de que los análisis seriados de cfDNA (Cell-free DNA) son una poderosa prueba para orientar el cuidado del CP, permitiendo la estratificación molecular de la enfermedad, la evaluación de la respuesta y el estudio de clones resistentes emergentes³⁶.

Annala et al., (2017) aleatorizaron 202 pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC), sin tratamiento previo de abiraterona o enzalutamida, pero sólo a 115 les realizaron el exoma completo y la secuenciación dirigida de 72 genes en el cfDNA, antes del tratamiento. Para estos medicamentos, que nunca se habían comparado antes, el tiempo hasta la progresión fue similar. Los defectos en *BRCA2* y *ATM* estuvieron fuertemente asociados con resultados clínicos pobres, independientemente de los factores pronósticos clínicos y la abundancia circulante de DNA tumoral. Las alteraciones somáticas en TP53, también se asociaron de forma independiente con la resistencia rápida. También se identificaron reordenamientos estructurales del gen AR que truncan el dominio de unión del ligando en varios pacientes con resistencia primaria. Estos hallazgos establecen los impulsores genómicos de resistencia a la terapia de AR de primera línea en mCRPC e identifican posibles biomarcadores mínimamente invasivos. También se muestra que la secuenciación de cfDNA proporciona un medio práctico para analizar estos potenciales biomarcadores que guían el tratamiento.⁴²

Seyedolmohadessin et al., (2015) evaluaron la pérdida de la heterocigosidad (LOH) en el ctDNA de pacientes con CP, utilizando 6 marcadores de secuencias cortas repetidas en tándem (STR) y encontraron que la LOH en los marcadores D8S360, D9S1748, D9S171, D8S137 y D6S1631 se encontraba significativamente más alta en los sujetos con CP que en los controles ($P < 0.05$). De los 6 marcadores STR, la LOH en D8S360 pudo discriminar entre PC metastásico y localizado.³⁷

Gordian et al., (2015) evaluaron el ctDNA en pacientes con APE (>4ng/ml) elevado y/o con un tacto rectal anormal y encontraron que la cuantificación de ctDNA mejora el valor predictivo negativo (93.1% vs 73.3%), así como la especificidad (33.1% vs 6.7%) de estos métodos para la detección de CP⁴³. Otros estudios que valoraron la utilidad del ctDNA para la detección de CP, sólo determinaron su cantidad, pero no describieron alteraciones particulares que permitieran establecer las características biológicas del tumor subyacente. Por lo tanto, los resultados de esta revisión sistemática sugieren que su estudio acerca de la identificación de biomarcadores genómicos (VNSs y VNCs) de detección en CP puede aumentar la especificidad y sensibilidad en el diagnóstico y eso puede reducir el número de biopsias de próstata innecesarias³⁸.

Wang et al., (2017) investigaron aberraciones del genoma en CP castración resistencia, estudiando a un total de 82 pacientes mediante secuenciación de exoma y de RNA, antes de iniciar tratamiento con abiraterona y prednisona. Se determinó la resistencia al medicamento a las 12 semanas usando el criterio de progresión que

incluye la medida de APE. Notaron que los pacientes que no respondían presentaban mayor frecuencia de mutaciones de los genes relacionados a la vía de Wnt/ β -catenina, así como los reguladores negativos de la señalización de Wnt/ β -catenina se suprimieron con mayor frecuencia o mostraron una expresión reducida de mRNA. La activación de la vía Wnt/ β -catenina y el aumento de las puntuaciones de progresión del ciclo celular pueden servir como marcadores moleculares para predecir la resistencia a la terapia con abiraterona y prednisona²⁸.

Hacia el desarrollo de un marco de medicina de precisión para el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC), Robinson *et al.*, (2015) establecieron una infraestructura de secuencia clínica multiinstitucional para llevar a cabo la secuenciación prospectiva del exoma completo y del transcriptoma de biopsias tumorales óseas o de tejidos blandos de una cohorte de 150 individuos afectados con mCRPC. Las aberraciones de los genes *AR*, *ETS*, *TP53* y *PTEN* fueron frecuentes (40% -60% de los casos), con alteraciones de *TP53* y *AR* enriquecidas en mCRPC en comparación con el cáncer de próstata primario. Identificaron nuevas alteraciones genómicas en *PIK3CAB*, *R-spondin*, *BRAF / RAF1*, *APC*, β -*catenina* y *ZBTB16/PLZF*. Por otra parte, las aberraciones de *BRCA2*, *BRCA1* y *ATM* se observaron a frecuencias sustancialmente más altas (19,3% en total) en comparación con las de los cánceres de próstata primarios. El 89% de las personas afectadas albergaba una aberración clínicamente accionable, incluyendo el 62,7% con aberraciones en *AR*, el 65% en otros genes relacionados con el cáncer y el 8% con alteraciones de la línea germinal patógena. Este estudio de cohortes proporciona información clínicamente procesable que podría afectar las decisiones de tratamiento para estos individuos afectados³⁴.

Objetivo principal

Identificar biomarcadores genómicos (*TMPRSS2-ETS*, *TP53*, *AR*, *PTEN*, *PIK3CA*, *RB1*, *APC*, *CDH1*, *MYC*, *BRCA2*, *ATM*) de detección temprana en cáncer de próstata mediante secuenciación del exoma.

8.1 Objetivos específicos

- 1) Establecer un grupo de pacientes con enfermedad prostática atendidos en el INCan y Hospital General "Dr. Manuel Gea González"
- 2) Crear una extensa base de datos clínicos, sociodemográficos y de seguimiento
- 3) Crear un biobanco de muestras provenientes de pacientes con sintomatología prostática que incluya sangre periférica (pellet, suero y plasma), muestras tumorales y tejido prostático sano (a partir de biopsia y prostatectomía y solo en caso de estar disponibles) y orina (pellet y sobrenadante)
- 4) Identificar las VNSs y VNCs presentes en el ctDNA de pacientes con CP mediante secuenciación del exoma
- 5) Validar aquellos VNSs y VNCs con capacidad de detección de CP en pacientes con confirmación histopatológica, en comparación con individuos asintomáticos y sin evidencia clínica ni de laboratorio de CP.
- 6) Determinar aquellas VNSs y VNCs asociadas con las características de agresividad del tumor (grado histológico, invasión, tamaño tumoral, metástasis a ganglios linfáticos, metástasis a distancia, invasión perineural, perivascular, etc.) de los pacientes con CP.

Hipótesis

Si los pacientes con CP presentan variantes en el ctDNA que permitirán determinar el riesgo, severidad y presencia de la enfermedad, entonces estas variantes serán buenos biomarcadores genómicos tempranos en pacientes que no hayan mostrado síntomas.

Diseño

Observacional analítico, Prolectivo, Transversal.

MATERIALES Y METODOS

Universo de estudio:

Todos los pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González y los del INCan que acudan al Departamento de Urología en el periodo de octubre 2018 a mayo 2019.

Población de estudio: Pacientes con síntomas obstructivos prostáticos y con APE elevado (>4ng/ml).

Tamaño de la muestra

El tamaño de Muestra es por conveniencia: 100 pacientes con CP del hospital general Dr. Manuel Gea González.

El tamaño de Muestra total (pacientes del Gea González e INCan) será por conveniencia de 700 casos.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión

- Hombres mayores de 18 años y con síntomas del tracto urinario inferior que acudan a Hospital Gral. "Dr. Manuel Gea González".
- Pacientes con APE elevado (>4 ng/ml) que por sospecha clínica ameriten biopsia de próstata.
- Que hayan firmado el consentimiento informado aprobado por el comité de ética en investigación del INCan.
- Consentimiento informado aprobado por el comité de ética en investigación del Hospital Gral. "Dr. Manuel gea González".
- Que sean atendidos en el INCan u Hospital General Dr. Manuel Gea González con síntomas o signos de enfermedad prostática y que no hayan sido diagnosticados ni tratados previamente por CP.

Criterios de Exclusión

- No aplica

Criterios de eliminación

- Retiro de consentimiento informado.

Definición de variables

Variables Principales		Variables Generales	
Variable	Escala	Variable	Escala
APE	Cuantitativa discreta	Edad	Cuantitativa discreta
Gleason	Cualitativa intervalar	Ocupación	Cualitativa discreta

Estadio clínico	Intervalo	Años de estudio	Cualitativa discreta
Síntomas Obstructivos (IPSS>7)	Cuantitativa nominal politómica		
ctDNA	Cuantitativa continua		
Tacto rectal	Cualitativa nominal dicotómica		
Cirugía	Cualitativa nominal dicotómica		
Medicamento quimioterapéutico	Cualitativa ordinal		
<i>TMPRSS2-ETS</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>TP53</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>AR</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>PTEN</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>PIK3CA</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>RB1</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>APC</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>CDH1</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>MYC</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>BRCA2</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
<i>ATM</i>	Cualitativa nominal dicotómica		
Metastásico	Cualitativa nominal dicotómica		
Castración resistencia	Cualitativa nominal dicotómica		
Tabaquismo	Cualitativa nominal dicotómica		
Diabetes	Cualitativa nominal dicotómica		
Hipertensión arterial	Cualitativa nominal dicotómica		

Descripción de procedimientos

Se plantea que esta cohorte de pacientes con CP, sirva para la determinación de otros biomarcadores (de diagnóstico, pronóstico, de resistencia a castración, etc.) en estudios posteriores.

Al acudir por primera vez al servicio de urología del INCan y del Hospital Gral. "Dr. Gea González" por **síntomas urinario-obstructivos o APE (>4ng/ml)** se tomarán muestras de sangre (15 ml) (Dr. Pascual Armando Cortes Raygoza).

En caso de confirmarse el diagnóstico de Cáncer de próstata y se requiera de tratamiento quirúrgico (prostatectomía radical) se me tomara adicional:

- 1) Muestra de sangre periférica (15 ml) adicional a lo requerido para sus laboratorios, un día previo al procedimiento quirúrgico. (Dr. Pascual Armando Cortes Raygoza)
- 2) Muestra de 50 ml de orina la cual se obtendrá durante la colocación de la sonda transuretral (Esta se debe de colocar durante el procedimiento quirúrgico de manera rutinaria). (Dr. Pascual Armando Cortes Raygoza)
- 3) Muestra de tejido Prostático de aproximadamente 1cm³ de la pieza final que se envía a patología (esta muestra será escogida por el personal de patología). (Dr. Pascual Armando Cortes Raygoza). Esta muestra será enviada con nitrógeno líquido y se capacitará previamente para el transporte de esta.

Obtención de datos clínicos:

La cohorte de pacientes con diagnóstico de CP incluye el reclutamiento de datos mediante un sitio web: (www.canprost.com). Esta captura será llenada por parte de personal clínico entrenado (urólogos adscritos del INCan y GEA) y solo se llenarán los datos que apliquen en cada caso:

1. Datos generales (Nombre, apellidos, fecha de nacimiento, escolaridad, ocupación, tabaquismo, historia familiar de cáncer, **historia familiar de cáncer de próstata o de mama**)

2. Diagnóstico (biopsia prostática, Nivel de APE, **resultados del tacto rectal**, resección transuretral de próstata, biopsia de saturación de la próstata, tipo de síntomas iniciales, fecha de biopsia prostática, numero de cilindros por biopsia, alteraciones histopatológicas en la biopsia, **Gleason**, Nivel de APE al diagnóstico. Resultados de estudios de imagen al momento del diagnóstico
3. **Cirugía** (tipo de abordaje quirúrgico, fecha de cirugía, complicaciones transoperatorias, estimación de sangrado, días de estancia hospitalaria, días de permanencia de la sonda vesical, estadificación patológica, nivel de APE postcirugía.
4. Radioterapia (RT): Fecha de inicio, progresión post RT, Número de consultas por año.
5. Tratamiento: Orquiectomía, fecha de la cirugía, uso de bloqueo hormonal combinado, APE y NADIR post bloqueo hormonal, **quimioterapia**, toxicidad por quimioterapia, uso de fármacos para salud ósea
6. Progresión: **resistencia a castración hormonal**, nivel de testosterona, estudio realizado para llegar al diagnóstico de CP resistente a la castración, tratamiento de segunda línea, necesidad de hospitalización, número de consultas durante el tratamiento con segunda línea
7. Estatus: estado del paciente en la última consulta [vivo, muerte por CP, muerte por otra causa], fecha de muerte y fecha de la última consulta.

I. Biobanco de muestras:

Se complementará un biobanco (INcan) de muestras provenientes de la cohorte de pacientes provenientes del Gea González e INcan con enfermedad prostática que incluirá sangre periférica (pellet, suero y plasma) y orina (pellet y sobrenadante), así como tejido prostático normal y tumoral. Para garantizar la calidad de toma y almacenamiento de las muestras, una persona previamente entrenada en INcan, realizará su disposición en nitrógeno líquido menor a 15 minutos, así como su almacenamiento en RNA-later, se usarán códigos de barras con todas las especificaciones de cada muestra.

II. Descubrimiento/validación de VNSs y VNCs en ctDNA para la detección de CP:

Fase de descubrimiento: Se seleccionarán aleatoriamente muestras (ctDNA y "DNA germinal) de pacientes con confirmación histopatológica de CP, a las cuales se les llevará a cabo el análisis de exomas y posterior a la detección de VNSs y VNCs mediante abordajes bioinformáticos.

III. Obtención del cfDNA y del DNA germinal:

Se tomarán 20 ml de sangre periférica a los 700 pacientes con CP, seleccionados aleatoriamente, se aislará el plasma mediante centrifugación a 2000g a 4°C durante 10 minutos. Se llevará a cabo la purificación del cfDNA, la cuantificación se realizará mediante el kit Quant-IT High Sensivity Picogreen Kit (Invitrogen). El DNA celular será extraído mediante el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA).

IV. Secuenciación de exomas:

Este procedimiento será llevado a cabo en laboratorio nacional- CONACYT de la FES-Iztacala-UNAM. Para analizar las alteraciones presentes en la región codificante del genoma humano (exoma) presentes en las muestras del ctDNA y del DNA celular, se emplearán sondas de RNA marcadas con biotina (Agilent, Santa Clara) dirigidas contra los 51 Mb de la secuencia que comprende los 220, 000 exones de los 23,000 genes humanos descritos en las bases de datos RefSeq (base de datos de secuencia de genomas y proteínas de la

NCBI) y CCDS (base de datos que identifica regiones de proteínas humanas y que pasaron los test de calidad) buscando intencionadamente *TMPRSS2-ETS*, *TP53*, *AR*, *PTEN*, *PIK3CA*, *RB1*, *APC*, *CDH1*, *MYC*, *BRCA2*, *ATM*. Se emplearán 200ng (totales) del DNA extraído de las muestras pareadas de cfDNA y germinal del mismo paciente. Se fragmentará el DNA en 150-400 pb por medio de sonicación. Se purificarán los fragmentos ligados empleando perlas magnéticas (AMPure Beckman Coulter, USA) y se amplificarán por PCR. Se cuantificarán y mezclarán las muestras en preparaciones de 8 a 16 muestras, las cuales serán hibridadas con las sondas de RNA marcadas con Biotina (Agilent Technologies, Santa Clara, California) dirigidas contra el exoma durante 12 h y posteriormente serán amplificadas mediante PCR. Se realizará un análisis de calidad de las bibliotecas por medio de microelectroforesis (High sensitivity DNA kit, Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa clara, California). Posteriormente se realizará un análisis de calidad de las bibliotecas por medio de electroforesis. Las bibliotecas serán secuenciadas empleando la plataforma de secuenciación masiva Illumina HiSeq 2500 (Illumina).

V. Análisis estadístico y bioinformático:

Para la Identificación de variaciones en nucleótidos sencillos (VNSs): se evaluará la calidad de las lecturas en los archivos FASTQ (obtenidos en la secuenciación de exomas) usando FastQC (versión 0.11.5),⁴⁷ lo cual nos permitirá detectar la presencia de lecturas de baja calidad, presencia de adaptadores propios de la plataforma de secuenciación masiva empleada (HiSeq 2500, Illumina). En base a este reporte se hará un filtrado de archivos FASTQ, utilizando CutAdapt (Versión 1.14)⁴⁸. Se tomará el genoma humano como referencia (versión Hg19) y las lecturas del archivo FASTQ se alinearán a esta referencia con BWA con el algoritmo "MEM". Posteriormente se hará un recalibrado de bases alineadas usando Picard (Versión 2.9.4) y GATK (versión 3.7) como sugieren los lineamientos establecidos por el Broad Institute⁵⁰. La identificación de variantes genéticas se llevará a cabo en dos fases:

- 1) Detección de variantes germinales mediante el algoritmo "HaplotypeCaller" de GATK (versión 3.7)
- 2) Detección de variantes somáticas (ctDNA): utilizando los alineamientos de las muestras pareadas (ctDNA: DNA germinal) se detectarán las mutaciones somáticas con Mutect2 y cm Detect.⁵¹ ambos grupos de variantes genéticas detectadas (germinales y somáticas) se anotarán con múltiples bases de datos de importancia.

Fase de validación: a partir de las VNSs y VNCs detectadas en la fase de descubrimiento, se validarán las top-10 VNSs y top-10 VNCs en 50 nuevas muestras de ctDNA de pacientes con CP obtenidas a partir de la cohorte. Esta fase incluirá la evaluación del cfDNA de 50 individuos asintomáticos y sin evidencia clínica ni de laboratorio de CP (controles), los cuales se reclutarán en las salas de espera del INCan y GEA

RESULTADOS

Por la naturaleza del estudio y su duración estos resultados son preliminares, teniendo faltantes las variantes genéticas dependientes de cada grupo. Se realizó una valoración estadística de las principales variables fenotípicas, condición social y de condición medica y si hay relación de esta con los resultados positivos en el

cáncer de prostata. Además de un análisis entre el grupo de pacientes de cáncer de prostata y su correlación directa con los resultados obtenidos.

Se obtuvieron un total de 197 muestras de los cuales pacientes sin enfermedad neoplásica fueron 62 (31.5%) y pacientes con enfermedad prostática fueron 135 (68.5%) (**Grafico 1**). Se obtuvo una media de edad de 67.64(DE=8.33) de pacientes con enfermedad neoplásica y 69.70 (DE=9.58), se presentó un promedio de escolaridad de 7.45(DE=4.8) en el brazo con CP y de 6.67(DE=5.786). No se relacionó el tabaquismo con 24 pacientes (38%) en el grupo sin neoplasia y de 57 individuos (42%) en el paciente con neoplasia con una p de .642. La frecuencia de comorbilidades fue Hipertensión arterial de 36% en el brazo sin neoplasia y de 28% en el brazo con neoplasia. Diabetes mellitus de 56% en el brazo sin neoplasia y de 35% en el brazo sin neoplasia. Se encontró un índice de masa corporal (IMC) de 27.28 (DE=3.65) en el brazo sin neoplasia y de 25.79 (DE=3.35). Se encontraron P significativas en diabetes, IMC y en APE inicial, con 0.011, .005 y de .054 respectivamente. (**Tabla 1**).

Se analizaron las ocupaciones a su vez dividida en ambos grupos encontrando como profesión más común comerciante y desempleado con 20% ambos rubros del grupo de pacientes sin neoplasia prostática y siendo lo más común No especificada con un 68% en el grupo con neoplasia. (**Tabla 2**).

Se realizo un análisis del APE la cual es una variable controlada dentro del estudio por tener grupo sin neoplasia. Se demostró la efectividad de ambos grupos con un APE inicial en el grupo sin neoplasia con una media de 2.38 (DE=2.86), y una media del grupo con neoplasia con una media de 251.07 (DE=1009.75) con un valor de p de 0.54.

A su vez se comprobaron los grupos mediante un análisis de cajas simple donde se nota la discrepancia entre ambos grupos y su homogeneidad entre los mismos.

DISCUSION

La naturaleza de la Tesis es encontrar marcadores en orina o sangre capaces de diagnosticar efectivamente el CP, sin necesidad ya de tener un marcador tan inespecífico como el APE. Se realizo un corte previo de las bases de datos obtenidos, el protocolo continuara hasta el análisis de los resultados genéticos.

Los resultados del estudio demuestran significancia en diabetes e IMC, los cuales se ha comprobado su relación directa entre diabetes elevando el riesgo a tener cáncer de prostata de 1 a 3 veces. En el 2019 Qi J realizo una comparación en la población china donde se eleva más el riesgo en cáncer de prostata en pacientes con diabetes mellitus 2 de 1 a 2 veces si está presente.⁴³

Los niveles de obesidad en México son extremos, teniendo en cuenta que somos el primer país en obesidad alrededor del mundo, ya se había comprobado anteriormente su relación directa con mayor probabilidad de padecer Cáncer de próstata, y esta se ha estudiado incluso como factor de mortalidad al poder determinar si su relación es directamente proporcional al estadio ganglionar del CP. Kelly et al en el 2018 estableció una cohorte de 153,730 pacientes donde relaciono el IMC a través de diferentes trayectorias. Definiendo como un mayor IMC a un mayor riesgo de tener CP avanzado a diferencia de los que tenían un IMC normal. Esto a su vez explicado debido a que en la obesidad se encuentran factores dependientes de los receptores de insulina los cuales se ha visto que están implicados en la patogenia del cáncer de próstata. Los resultados obtenidos en la tesis son esperados y están acordes a lo anteriormente publicado.⁴³

Al realizar un análisis de otras variables como los años de tabaquismo, años de escolaridad no se encuentra una relación directa entre los pacientes que tenían CP y los que no.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que son similares a lo propuesto en metaanálisis previos y la relación de pacientes sanos vs los ya diagnosticados con CP son similares a lo propuesto en otros países. Es importante hacer notar que el verdadero objetivo del estudio es el de encontrar variaciones genéticas entre ambos grupos. Las variaciones de condición social, comorbilidades, y de estado actual del paciente no son suficientes para justificar un mayor screening en esa población. Por lo que los grupos son adecuados para el tipo de estudio a desarrollar

CONCLUSIONES

El CP es una enfermedad prevalente en cualquier tipo de población siendo el cáncer más común en nuestro país y en diversos de manera internacional. Es importante conocer métodos de diagnóstico mas precisos de manera temprana para evitar así la mortalidad por el mismo, y disminuir sobre todo el sobrediagnóstico y en su caso el sobre tratamiento al tener pruebas tan inespecíficas como el APE.

La utilidad de la biopsia líquida se esta probando con resultados óptimos y con diversas utilidades que van desde el diagnóstico inicial hasta el pronóstico de la misma enfermedad, y también juega un papel dentro de las resistencias a medicamentos quimioterapéuticos.

Las poblaciones estudiadas reflejan datos ya demostrados del cáncer de próstata, lo que indican que nuestra población es similar a la presentada en trabajos internacionales y se puede utilizar para el estudio propuesto. Es necesario contar con los resultados biogenéticos que demuestren la utilidad real de la prueba.

Bibliografia

1. Hofmann R, Heindenreich A & Moul J. W. Prostate Cancer. Springer 2012: 235-289
2. Ruddon, R W Cancer Biology. Oxford University Press (2007):56-92
3. Dicker AP, Kevin KW, Trabulsi EJ, Zaorsky, NG. Prostate Cancer. Demos Medical Publishing. 2014;1:164-185
4. Park S, Haiman C, Cheng I, Park S, Wilkens L, Kolonel L, Le Marchand L, Henderson B. Racial/ethnic differences in lifestyle-related factors and prostate cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Causes & Control*, 2015; 26(10):1507-1515.
5. Lunenfeld B. The ageing male: demographics and challenges. *World Journal of Urology*, 2002;20(1):11-16.
6. Helgesen F, Holmberg L, Johansson J, Bergstrom R, Adami H. Trends in Prostate Cancer Survival in Sweden, 1960 Through 1988: Evidence of Increasing Diagnosis of Nonlethal Tumors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, (1996) 88(17):1216-1221.
7. Cancer Today-Global Cancer Observatory. Available at <https://gco.iarc.fr/today/home>. (accessed 2017).
8. Cancer Statistics Center – American Cancer Society. Available at <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/cancer-site/Prostate> (accessed 2017).
9. Bray F, Piñeros M. Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. *Salud Pública de México*, 2016;58(2):104-117.
10. Brandes A, Koerber F, Schwarzkopf L, Hunger M, Rogowski W, Waidelich R. Costs of conservative management of early-stage prostate cancer compared to radical prostatectomy—a claims data analysis. *BMC Health Services Research*, 2016;16(1).
11. Roehrborn C, Black L. The economic burden of prostate cancer. *BJU International*, (2011). 108(6):806-813.
12. Zhang W, Meng Y, Liu N, Wen X, Yang T. Insights into Chemoresistance of Prostate Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 2015;11(10):1160-1170.
13. Siegel R, Miller K, Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2015;65(1): 5-29.
14. Aravanis A, Lee M, Klausner R. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell*, 2017;168(4):571-574.
15. Schiffman J, Fisher P, Gibbs P. Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2015;35:57-65.
16. Berry D. Failure of researchers, reviewers, editors, and the media to understand flaws in cancer screening studies: Application to an article in *Cancer*. *Cancer*, 2014;120(18):2784-2791.
17. Bryan N. Diagnosis of prostate cancer: optimal number of prostate biopsies related to serum prostate specific antigen and findings on digital rectal examination. *Current Opinion in Urology*, 1998;8(4):339.
18. Velonas V, Woo H, Remedios C, Assinder S. Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013;14(6):11034-11060.
19. Moyer V. A. U. S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer U.S. Preventive services task force recommendation statement. *Annals of internal medicine* 2012;157:120-134
20. National comprehensive Cancer Network guidelines, Prostate Cancer Version 2.2018-March 8, 2018 NCCN.org
21. Wang C, Li YM, Fang XD. Research progress on liquid biopsy in oncology and its clinical applications 2017;39(3):220-231
22. Fu Y, Jovelet C, Filleron, T, Pedrero M, Motte N, Boursin Y, Luo Y, et al. Improving the Performance of Somatic Mutation Identification by Recovering Circulating Tumor DNA Mutations. *Cancer Research*, 2016;76(20):5954-5961.
23. Bettegowda C, Sausen M, Leary R, Kinde I, Agrawal N, Bartlett B et al. Detection of circulating tumor dna in early and late stage human malignancies. *Neuro-Oncology*, 2014;16(suppl 3)
24. Salvianti F, Orlando C, Massi D, De Giorgi V, Grazzini M, Pazzagli M, Pinzani, P. Tumor-Related Methylated Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells in Melanoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016;2.
25. Chedgy E, Annala M, Beja K, Warner E, Gleave M, Chi K, Wyatt A. Moving Toward Personalized Care: Liquid Biopsy Predicts Response to Cisplatin in an Unusual Case of BRCA2-Null Neuroendocrine Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 2016;14(2):233-e236.
26. Que D, Xiao H, Zhao B, Zhang X, Wang Q, Xiao H, et al. EGFR mutation status in plasma and tumor tissues in non-small cell lung cancer serves as a predictor of response to EGFR-TKI treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 2016;17(3):320-327.
27. Dorbeau M, Bazille C, Bibeau F. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Côlon & Rectum*, 2017;11(2):117-118.

28. Wang L, Dehm S, Hillman D, Sicotte H, Tan W, Gormley M et al. A prospective genome-wide study of prostate cancer metastases reveals association of wnt pathway activation and increased cell cycle proliferation with primary resistance to abiraterone acetate–prednisone. *Annals of Oncology*. 2017;29(2):352-360.
29. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp L, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P et al. Hypermethylation of Cell-Free Serum DNA Indicates Worse Outcome in Patients With Bladder Cancer. *The Journal of Urology*, 2008;179(1):346-352.
30. Bamshad M, Ng S, Bigham A, Tabor H, Emond M, Nickerson D, Shendure, J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 2011;12(11):745-755.
31. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True L, Gulati R Et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nature Medicine*. 2016;22(4):369-378.
32. Loeb K, Loel L. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 2000;21(3):379-385.
33. Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, Jassem J, Fabi A, O'Brien T, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2012;107(5):793-799.
34. Robinson D, Eliezer M, Yi-Mi W, Nikolaus S, Robert J, Mosquera J et al, Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer, *Cell* 2015; 161(5):1215-1228
35. Cui H, Dhroso A, Johnson N, Korkin D. The variation game: Cracking complex genetic disorders with NGS and omics data. *Methods*, 2015;79-80:18-31.
36. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discovery*. 2017;7(9):1006-1017.
37. Seyedolmohadessin S, Akbari M, Nourmohammadi Z, Basiri A, Pourmand G. Detection of Loss of Heterozygosity (LOH) Using Circulating Cell-free DNA (cfDNA) by Fluorescence-based Multiplex PCR for Identification of Patients With Prostate Cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2017:1.
38. Gordian E, Ramachandran K, Reis I, Manoharan M, Soloway M, Singal R. Serum Free Circulating DNA Is a Useful Biomarker to Distinguish Benign versus Malignant Prostate Disease. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010;19(8):1984-1991.
39. Altimari A, Grigioni A, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinell A et al. Diagnostic Role of Circulating Free Plasma DNA Detection in Patients With Localized Prostate Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008;129(5):756-762.
40. Papadopoulou e, davilas e, sotiriou v, georgakopoulos e, georgakopoulou s, koliopanos A et al. Cell-free DNA and RNA in Plasma as a New Molecular Marker for Prostate and Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1075(1):235-243.
41. Jayaram A, Wetterskog D, Attard G. Plasma DNA and Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Odyssey to a Clinical Biomarker Test. *Cancer Discovery*. 2018;8(4):392-394.
42. Annala M, Vandekerkhove G, Khalaf D, Taavitsainen S, Beja K, Warner E et al. Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discovery*. 2018;8(4):444-457.
43. Qi J, He P, Yao H, Song R, Ma C, Cao M et al. Cancer risk among patients with type 2 diabetes: A real-world study in Shanghai, China. *Journal of Diabetes*. 2019.
44. Kelly S, Lennon H, Sperrin M, Matthews C, Freedman N, Albanes D et al. Body mass index trajectories across adulthood and smoking in relation to prostate cancer risks: the NIH-AARP Diet and Health Study. *International Journal of Epidemiology*. 2018;48(2):464-473.

Gráficos y tablas.

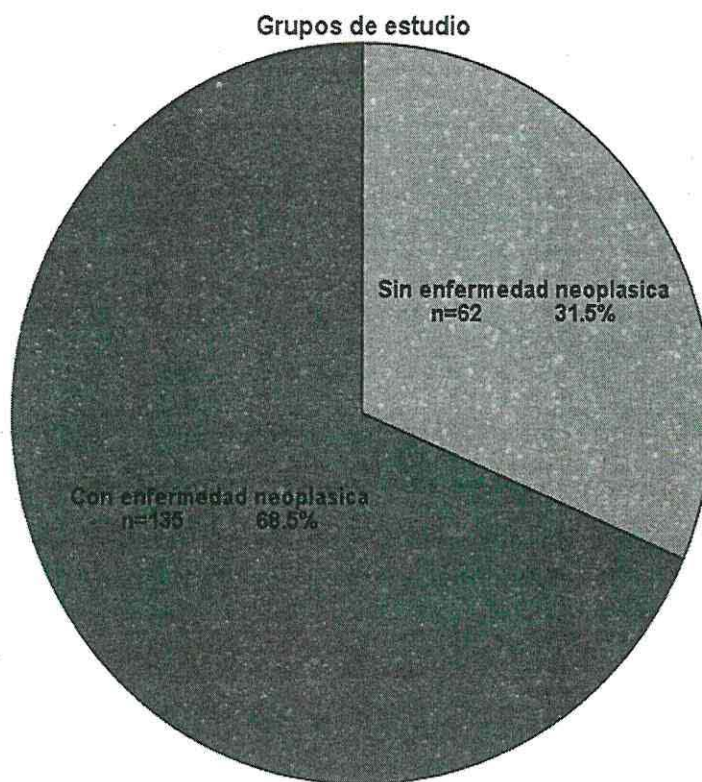


Gráfico 1.- Grafica de pastel comparativa de los grupos de estudio entre individuos con enfermedad neoplásica vs. Sin enfermedad neoplásica

Variable	Sin Enf. Neoplasia (62)		Con Enf. Neoplásica (135)		Valor de P
	Media o n	DE o %	Media o n	DE o %	
Edad	67.64	8.33	69.70	9.58	.108
Años	7.45	4.878	6.67	5.786	.359
Escolaridad					
APE inicial	2.38	2.86	251.07	1009.75	.054
Hipertensión arterial (+)	18	36%	48	28%	.368
Diabetes (+)	11	56%	48	35%	.011
Tabaquismo (+)	24	38%	57	42%	.642
IMC	27.28	3.65	25.79	3.35	.005

Tabla 1.- Tabla de características clínicas de los pacientes obtenidos de los pacientes con y sin enfermedad Neoplásica. DE= Desviación estándar, IMC=Índice de Masa Corporal

Variable	Sin Enf. Neoplasia (62)		Con Enf. Neoplásica (135)		Valor de P
	Media o n	DE o %	Media o n	DE o %	
Ocupación					
Comercio	13	20%	0	0%	.000
Hogar	0	0%	2	1%	
Profesionista	2	3%	0	0%	
Independiente					
Empleado	11	17%	14	10%	
Obrero	8	12%	16	11%	
Trabajador agrícola	12	19%	2	1%	
agrícola					
Desempleado	13	20%	32	23%	
No Especificado	3	4%	68	50%	
Estudiante	0	0%	1	1%	

Tabla 2.- Tabla de características de Ocupación de los individuos con y sin enfermedad neoplásica calculado con valor de p mediante χ^2 . DE=Desviación estándar

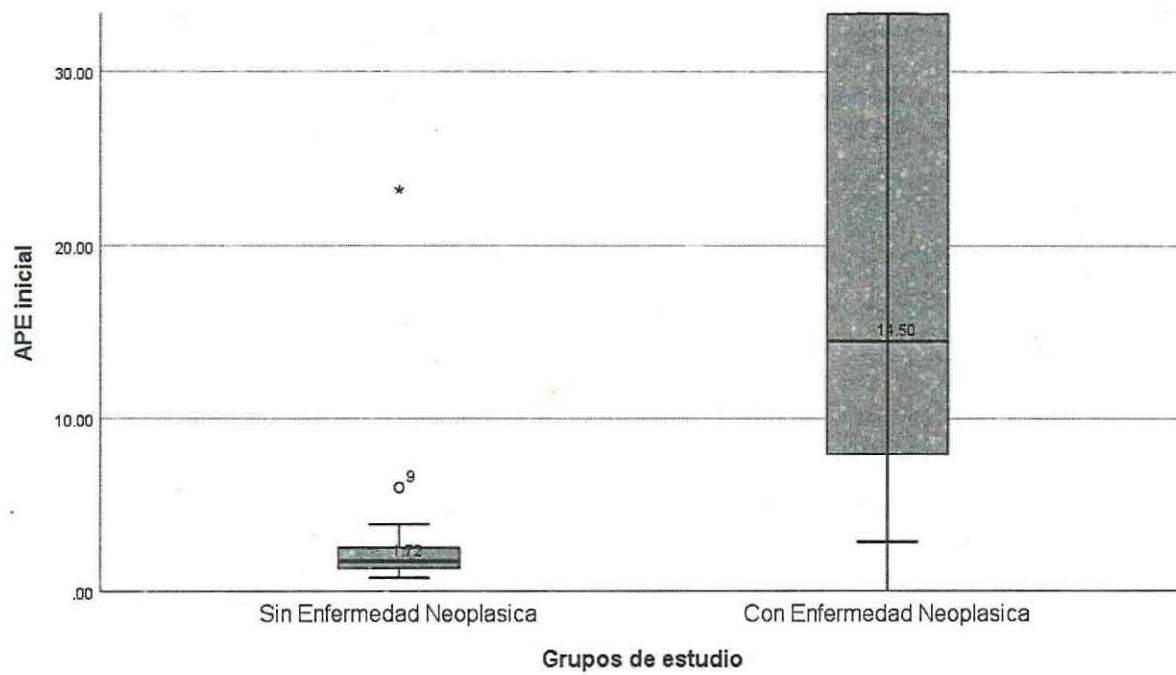


Gráfico 2.- Diagrama de cajas simple comparativo entre individuos con enfermedad neoplásica y sin enfermedad neoplásica, se nota la diferencia esperada entre ambos grupos. APE: Antígeno Prostático Específico.