



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Caracterización de genes relacionados al receptor de andrógenos en
pacientes mexicanos con cáncer de próstata”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Jorge Luis Ramírez Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Greco Hernández Ramírez
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Octubre, 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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por el proyecto de Investigación en Salud FOSISS-CONACyT, Convocatoria 2016-1, del Dr. Greco Hernández. Proyecto #273116: “Identificación de nuevas mutaciones en el receptor de andrógenos específicas de población mexicana y su impacto clínico en cáncer de próstata”. Asimismo, también fue financiada parcialmente por el INCAN.

Agradezco a las siguientes personas, cuyo aporte fue fundamental para el desarrollo de esta tesis: al Dr. Greco Hernández, por la dirección general de esta tesis en su laboratorio de “Traducción y Cáncer” en el INCAN; al Dr. Abraham Pedroza Torres, por su excelente asesoría teórica y apoyo experimental durante el diseño y ejecución de este proyecto; a la M. en C. Pamela A. González, por la colecta de las biopsias que se utilizaron en este estudio y el establecimiento de la base de datos clínicos de los pacientes cuyas biopsias fueron estudiadas; al Dr. Alfonso Méndez Tenorio, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., cuyo equipo y asesoría fueron fundamentales para realizar los experimentos de secuenciación masiva de esta tesis; al Dr. Miguel Ángel Jiménez Ríos, Jefe del Departamento de Urología del INCAN, por la estrecha colaboración con nuestro equipo para realizar la colecta de biopsias y el establecimiento de la base de datos clínicos de los pacientes; a mi comité tutor, Dra. Mayel Chirinos y Dra. Marcela Lizano, que me hicieron excelentes críticas y retroalimentación, tanto teóricas como experimentales, a lo largo de este trabajo; y finalmente al CONACyT, por haberme otorgado financiamiento económico para realizar esta tesis a través de una beca de Maestría (número de apoyo: 482690).

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Índice de tablas	I
Índice de figuras	I
Índice de abreviaturas	III
Resumen	V
Antecedentes	1
-) Próstata	1
-) Andrógenos	1
-) Vía canónica del receptor de andrógenos	4
-) Vía canónica de señalización del AR en Cáncer de Próstata	5
-) Cáncer de próstata	9
-) Epidemiología del Cáncer de Próstata	9
-) Diagnóstico del Cáncer de Próstata	10
-) Clasificación del Cáncer de Próstata	11
-) Factores de riesgo.	13
-) Edad.	14
-) Grupo étnico.	14
-) Historia familiar.	16
-) Variantes de riesgo.	17
-) Modelo de predisposición genética.	18
Justificación	19
Pregunta de investigación	19
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivos particulares	19
Materiales y métodos	20
-) Muestras clínicas.	20
-) Extracción de DNA genómico.	20
-) Diseño del panel.	20
-) Cuantificación del DNA genómico.	22
-) Preparación de las bibliotecas.	22
-) Secuenciación de las bibliotecas.	24
-) Descarga de resultados.	25
-) Procesamiento de resultados.	25
Resultados	26
-) Comparación de variables clínicas en ambos grupos.	26
-) Panel de genes seleccionados.	28
-) Muestras secuenciadas.	30
-) Número de mutaciones encontradas.	30
-) Tipos de variantes encontradas en muestras tumorales.	32

	Página
Mutaciones encontradas en cada gen para ambos grupos	33
-) Mutaciones encontradas en <i>AR</i>	34
-) Mutaciones encontradas en <i>TP53</i>	36
-) Mutaciones encontradas en <i>FOXO1</i>	37
-) Mutaciones encontradas en <i>SPOP</i>	38
-) Mutaciones encontradas en <i>FOXA1</i>	39
-) Mutaciones encontradas en <i>TMPRSS2</i>	40
-) Mutaciones encontradas en <i>MTOR</i>	41
-) Mutaciones encontradas en <i>NCOR1</i>	42
-) Mutaciones encontradas en <i>MDM2</i>	43
-) Mutaciones encontradas en <i>HSP90AA1</i>	44
-) Mutaciones encontradas en <i>SRD5A2</i>	45
-) Mutaciones encontradas en <i>MAPK1</i>	46
-) Mutaciones encontradas en <i>CYP17A1</i>	47
-) Mutaciones encontradas en <i>eIF4E</i>	48
-) Genes con mutaciones exclusivas en muestras tumorales.	49
-) Mutaciones con una correlación positiva con variables clínicas	50
-) Predicciones de impacto funcional	51
-) Genes con mutaciones relevantes en la vía de señalización del AR	53
Reportes en otros estudios	55
-) Reportes de mutaciones de <i>TP53</i> en otros estudios.	55
-) Reportes de mutaciones de <i>AR</i> en otros estudios.	55
-) Reportes de mutaciones de <i>SPOP</i> en otros estudios	56
Discusión	57
-) Variables clínicas entre ambos grupos.	57
-) Variables clínicas de pacientes con CaP.	57
-) Genes con el mayor número de muestras mutadas.	58
-) Tipos de variantes encontradas en las muestras tumorales.	59
-) Mutaciones exclusivas de muestras tumorales.	60
-) Mutaciones con una correlación positiva con niveles elevados de APE en sangre	61
-) Predicciones de impacto funcional.	62
-) Genes con mutaciones relevantes en la vía de señalización del AR.	63
-) Reportes en otros estudios.	64
-) Variantes encontradas en muestras no tumorales.	65
Conclusiones	67
Referencias	68
Material adicional	76
-) Anexo 1. Reportes en otros estudios de las variantes encontradas.	76
-) Anexo 2. Consentimiento informado.	79
-) Anexo 3. Elaboración de la figura 3	84

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de variables clínicas entre los dos grupos de estudio.	21
Tabla 2. Panel de genes seleccionados para el estudio.	22
Tabla 3. Mutaciones con una correlación estadística positiva con niveles elevados de APE en sangre	50
Tabla 4. Predicción del impacto funcional de las mutaciones presentes en muestras tumorales utilizando Polyphen-2 como herramienta <i>in silico</i> .	52

Índice de figuras

Figura 1. Ruta metabólica para la biosíntesis de testosterona.	3
Figura 2. Mecanismo de acción del AR y su relación con los genes seleccionados.	7
Figura 3. Incidencia ajustada por edad de cáncer de próstata a nivel mundial.	10
Figura 4. Número de muestras tumorales y no tumorales con variantes funcionales por gen.	31
Figura 5. Tipos de variantes encontradas y su frecuencia en muestras tumorales.	32
Figura 6. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en el gen <i>AR</i> .	35
Figura 7. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en el gen <i>AR</i> .	36
Figura 8. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>FOXO1</i> .	37
Figura 9. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>SPOP</i> .	38

Figura 10. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>FOXA1</i> .	39
Figura 11. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>TMPRSS2</i> .	40
Figura 12. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>MTOR</i> .	41
Figura 13. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>NCOR1</i> .	42
Figura 14. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>MDM2</i> .	43
Figura 15. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>HSP90AA1</i> .	44
Figura 16. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>SRD5A2</i> .	45
Figura 17. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>MAPK1</i> .	46
Figura 18. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>CYP17A1</i> .	47
Figura 19. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en <i>eIF4E</i> .	48
Figura 20. Número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales.	49
Figura 21. Genes con mutaciones relevantes y su relación con la vía del AR.	54

Índice de abreviaturas

AR: En inglés *Androgen Receptor* , receptor de andrógenos.

AA: Afro-americanos

AREs: En inglés *Androgen response elements*, elementos de respuesta a androgenos

CaP: Cáncer de próstata

CDS: En inglés *coding DNA sequence*, secuencia de DNA codificadora

COSMIC: En inglés *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer

CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración

DBD: En inglés *DNA binding domain*, dominio de unión a DNA

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHT: Dihidrotestosterona

DNA: En inglés *Deoxiribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

EA: Europeo-americanos

FAT: En inglés *focal adhesión targeting region*, región de focalización de adhesión

FGF: En inglés *fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos

GnRH: En inglés *Gonadotropin-releasing hormone agonist*, hormona liberadora de la hormona luteinizante

GWAS: En inglés *Genome-wide association studies*, estudios de asociación de genoma completo

HEAT: En inglés *Huntington Elongation Factor 3, PR65/A, TOR*, Factor de elongación 3 Huntington, PR65/A, TOR.

HSD: Hidroxiesteroide deshidrogenasa

HSP90: En inglés *Heat shock protein 90*, proteína de choque térmico 90

IGF-I: En inglés *Insuline Like Growth Factor I*, factor de crecimiento semejante a la insulina

IMC: Índice de masa corporal

LBD: En inglés *Ligand binding domain*, dominio de unión a ligando

LH: En inglés *Leutinizing hormone*, hormona leutinizante

MAPK: En inglés *Mitogen-activated protein kinases*, proteínas cinasas activadas por mitógenos

MATH: En inglés *mepirin and traf homology*, dominio de homología con Meprin y traf

mRNA: En inglés *messenger Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico mensajero

NES: En inglés *nuclear exporting signal*, señal de exportación nuclear

NLS: En inglés *Nuclear localization signal*, señal de localización celular

NTD: En inglés *N-terminal domain*, dominio N-terminal

PAP: En inglés *Prostate alkaline phosphatase*, fosfatasa alcalina prostática

PCR: En inglés *Polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PSA: En inglés *Prostate specific antigen*, antígeno prostático específico

SEER: En inglés *Surveillance, Epidemiology and End Result Programs*, programas de vigilancia, epidemiología y resultados finales.

SNPs: En inglés *Single nucleotide polymorphism*, Polimorfismos de Nucleótido Único

SRCR: En inglés *Scavenger receptor cystein-rich*, Receptor del dominio de proteína rica en cisteína

TAD: En inglés *trans activation domain*, dominio de transactivación

TAD 1/2: En inglés *Topologically associating domain*, dominio de asociación topológica

RESUMEN

Antecedentes. Los andrógenos son hormonas esteroideas con un papel esencial en el desarrollo normal de la próstata. Dichas hormonas ejercen su efecto regulador mediante la activación de la vía canónica del receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés de *Androgen Receptor*, nombre del gen). Debido a que las células prostáticas requieren del funcionamiento adecuado de la vía del AR para proliferar y crecer de forma controlada, una de las vías mayormente afectadas en cáncer de próstata (CaP) es precisamente la del AR. Los factores de riesgo establecidos para el desarrollo de CaP son: la edad, la historia familiar, la presencia de variantes génicas de riesgo y el grupo étnico. La incidencia y mortalidad del CaP varía de forma notable a través de los diferentes grupos étnicos estudiados, también llamados fondos genéticos. De manera general, se ha observado claramente que los individuos afro-descendientes tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad con respecto a los demás grupos étnicos; sin embargo, el grado de riesgo puede variar entre poblaciones del mismo grupo étnico cuando el grupo se considera de poblaciones genéticamente mixtas (como los grupos de ascendencia hispanica). El grado de variabilidad puede atribuirse a la presencia de variantes genéticas específicas de cada población. Al día de hoy, existen escasos estudios que evalúen las mutaciones específicas de diferentes genes relacionados al desarrollo de cáncer de próstata en poblaciones de origen mexicano, mestizo.

Objetivo. Identificar mutaciones en genes relacionados a la vía canónica del AR en pacientes mexicanos con CaP.

Materiales y Métodos. Se realizó la extracción de DNA genómico de 96 biopsias de tejido prostático, de las cuales 64 se clasificaron como "Tumorales" y 32 como "No tumorales". Se diseñó un panel de secuenciación de 15 genes que han sido fuertemente asociados al desarrollo de CaP y que además guardan una relación funcional con la vía del AR. Mediante secuenciación masiva de siguiente generación en un equipo y plataforma digital Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific) se realizó la secuenciación masiva de los 15 genes seleccionados en las 96 muestras de DNA genómico. Se analizó la frecuencia de mutaciones por

cada gen en los dos grupos de estudio. Se utilizaron herramientas bioinformáticas para calcular el posible impacto funcional de las mutaciones encontradas. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la presencia de las mutaciones encontradas en otros estudios y su relación con la enfermedad.

Resultados. Se encontró que los genes mayormente mutados en las muestras tumorales fueron *TP53*, *FOXO1*, *AR* y *TMPRSS2*. Al comparar la incidencia de las mutaciones en ambos grupos (Tumorales vs No Tumorales) se encontró que los genes con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales fueron, en este orden: *AR*, *MTOR*, *SPOP* y *FOXA1*. La predicción del impacto funcional de las mutaciones encontradas mostró que los genes con la mayor cantidad de mutaciones predictivamente deletéreas fueron: *SPOP* y *MTOR*.

Conclusiones. Los genes que se encuentran mayormente mutados en tejido tumoral en la población estudiada fueron *AR*, *SPOP* y *MTOR*. Los genes mayormente mutados en nuestro estudio codifican para proteínas que tienen una relación estrecha con la vía canónica del receptor de andrógenos. Se identificaron mutaciones somáticas no reportadas en estudios de otras poblaciones.

ANTECEDENTES

Próstata

Es un órgano glandular con forma piramidal localizado a la altura de la pelvis debajo de la vejiga urinaria y frente al recto. Su función principal es secretar y almacenar líquido seminal que constituye el 25-30% del volumen total del semen. De manera general, el líquido seminal está compuesto por fructuosa, zinc y enzimas proteolíticas entre las que destaca el antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés, *Prostate specific antigen*) y la fosfatasa alcalina prostática (PAP por sus siglas en inglés *Prostate alkaline phosphatase*)^{1,2}. Anatómicamente, la próstata se divide en tres zonas principales: periférica, de transición y central. La zona periférica constituye alrededor del 70% del tejido normal prostático y es la donde se originan la mayoría de los tumores prostáticos³. El epitelio glandular prostático está compuesto por tres tipos de células: luminales, basales y neuroendocrinas. Las células epiteliales de la próstata son las encargadas de la síntesis de PSA, una proteasa de serinas que posee actividad lítica sobre el coágulo eyaculatorio que promueve la motilidad espermática⁴. Las células del epitelio glandular expresan receptores de andrógenos (AR por sus siglas en inglés, *Androgen Receptor*) y dependen de la acción de dicha proteína para proliferar¹.

Andrógenos

Son hormonas esteroides que juegan un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de la fisiología normal de la próstata⁵. La biosíntesis de andrógenos comienza a partir de colesterol, que sufre una serie sucesiva de modificaciones, primero convertido en esteroides de 21 átomos de carbono y finalmente en andrógenos de 19 carbonos. La síntesis de andrógenos ocurre en dos tejidos distintos: las cortezas adrenales y las células de Leydig en los testículos, siendo las segundas las mayores productoras de andrógenos⁶. Al entrar en las células de Leydig, el colesterol es transformado a pregnenolona dentro de la mitocondria, por acción de la enzima CYP11A. La pregnenolona es transportada

de la mitocondria al retículo endoplásmico liso, donde se lleva a cabo el resto de la esteroidogénesis. Mediante dos reacciones sucesivas reguladas por la enzima CYP17A1, la pregnenolona es biotransformada en una primera reacción en 17- α -hidroxipregnenolona y posteriormente en una segunda reacción en dehidroepiandrosterona (DHEA). La DHEA es transformada en androstenediona mediante la acción de la enzima 17 β -HSD, como último paso la androstenediona es transformada en testosterona por acción de la 3 β -HSD⁷ (Figura 1).

La biosíntesis de andrógenos está estrechamente regulada por la acción del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La liberación de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (GnRH por sus siglas en inglés, *Gonadotropin-releasing hormone agonist*) por parte del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés, *Leutinizing hormone*) por parte de la hipófisis. Finalmente, la LH estimula a las células de Leydig para que comiencen la síntesis de andrógenos.

En las células prostáticas, la testosterona puede actuar directamente sobre el receptor de andrógenos (AR), o bien puede ser transformada de manera irreversible en dihidrotestosterona (DHT) mediante la acción de la enzima 5- α -reductasa codificada por el gen *SRD5A2*. La DHT puede provocar una respuesta 10 veces más potente que la testosterona para estimular los genes blancos del AR⁸.

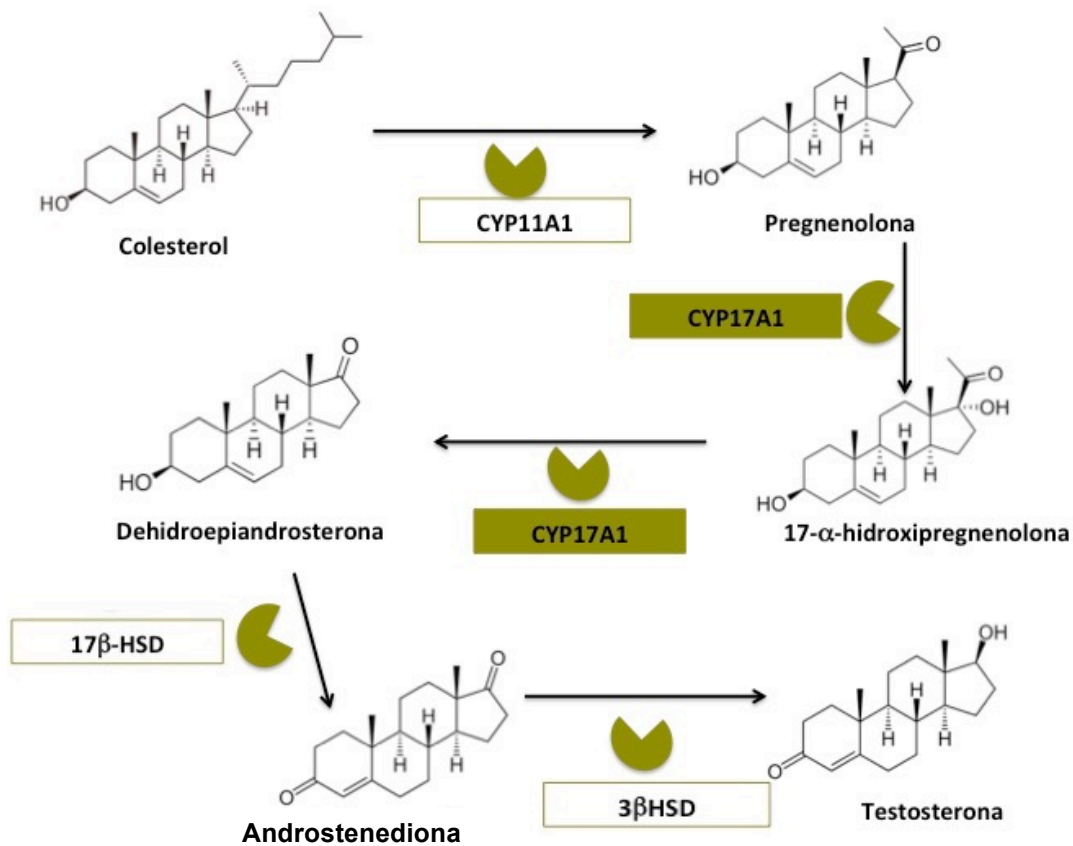


Figura 1. Ruta metabólica para la biosíntesis de testosterona. La testosterona es sintetizada a partir de colesterol mediante las reacciones enzimáticas mostradas que están reguladas por las siguientes enzimas; CYP11A1, enzima de corte de cadena lateral del colesterol; CYP17A1, la cual está involucrada en dos reacciones sucesivas de la ruta, transformando la pregnenolona en 17- α -hidroxipregnenolona, y en una segunda reacción se obtiene dehidroepiandrosterona; 17- β -HSD, deshidrogenasa encargada de la síntesis de androstenediona; 3 β HSD, oxidoreductasa encargada de la última reacción de la ruta, al transformar androstenediona en testosterona (Modificado de Ferraldeschi *et al.* 2014)⁷.

Vía canónica de señalización del receptor de andrógenos (AR)

El AR es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando. Sus principales ligandos son la testosterona y la DHT, siendo la segunda la que promueve una mayor actividad biológica⁸. Estructuralmente, está compuesto de cuatro dominios funcionales; un dominio amino terminal (NTD), región mediante la cual el AR interactúa con sus reguladores; un dominio de unión a DNA (DBD por sus siglas en inglés, *DNA binding domain*); una región bisagra y un dominio de unión a ligando (LBD por sus siglas en inglés, *ligand binding domain*).

Cuando el AR está en su forma inactiva (monomérica y no fosforilada), se encuentra en el citoplasma anclado a elementos del citoesqueleto y asociado a diferentes chaperonas (proteínas de choque térmico, principalmente HSP90) que lo protegen de ser degradado y le dan la conformación adecuada para su interacción con los ligandos⁹. Al unirse con alguno de sus ligandos, el AR se disocia del complejo formado con sus chaperonas y es fosforilado por diferentes vías, como la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés: *Mitogen-activated protein kinases*), lo que favorece su translocación al núcleo. La exportación nuclear está regulada por una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés, *nuclear localization signal*) dentro de la región bisagra del AR¹⁰. Dentro del núcleo, el AR cambia su conformación provocando una interacción proteína-proteína entre el extremo carboxilo de un AR y el extremo amino receptor de otro AR, provocando así la dimerización del receptor. La dimerización le provee estabilidad en la interacción ligando-LBD^{11,12}. Al interactuar con DNA, el AR localiza y se une a regiones específicas conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (AREs por sus siglas en inglés, *Androgen response elements*), las que se encuentran en las regiones promotoras y *enhancers* de los genes blanco del AR¹³. La unión del AR a los AREs está regulada por distintas proteínas coreguladoras que funcionan tanto como coactivadores (por ejemplo FOXA1, NKX3-1) o corepresores (por ejemplo NCOR1, FOXO1) de la actividad del AR. Actualmente, se conocen aproximadamente 300 coreguladores del AR, que actúan de forma conjunta para activar genes de manera específica^{14,15,16}. Los coreguladores ejercen su acción al

interactuar con el dominio NTD del AR; por su parte los coactivadores comúnmente se asocian con el AR para asegurar la transcripción efectiva de los genes blanco, mientras que los corepresores se asocian con el AR para decrementar su afinidad por las AREs y disminuir la transcripción de los genes blanco del AR. Los corre reguladores también pueden reclutar a otros factores de transcripción para regular la transcripción de genes blanco.

Otras proteínas regulan la actividad del AR al modificarlo enzimáticamente; por ejemplo, la proteína SPOP es una ubiquitina ligasa involucrada en la degradación del AR vía señalización por ubiquitinas y degradación por proteosoma¹⁷, acción realizada mediante el mismo mecanismo por la ubiquitina ligasa MDM2¹⁸.

Cuando el AR está activo, promueve la transcripción de diversos genes entre los cuales destaca el *PSA* (Figura 2).

Vía canónica de señalización del AR en Cáncer de Próstata

Debido a que las células prostáticas requieren del funcionamiento adecuado de la vía canónica de señalización del AR para proliferar y crecer, el principal tratamiento para el cáncer de próstata (CaP) localizado y recurrente es la privación de andrógenos o castración química. El proceso consiste en bloquear la producción de andrógenos, ya sea mediante la inhibición de la acción de la hormona luteinizante utilizando análogos químicos de dicha hormona o mediante la castración quirúrgica. La castración puede ser acompañada por tratamiento de antagonistas del AR que evitan la acción de andrógenos residuales¹⁹. A pesar de que en un principio el tratamiento es efectivo, casi de forma inevitable el CaP evoluciona a un estadio incurable y letal de la enfermedad conocido como CaP resistente a la castración (CPRC)²⁰.

Cuando el CaP transiciona a un CPRC, la vía del AR originalmente abatida vuelve a ser funcional por distintos mecanismos. Se ha reportado que más del 70% de los casos de CPRC presentan aberraciones de la vía canónica del AR²¹. Los mecanismos mayormente descritos de resistencia a la castración son los siguientes:

Amplificación del AR: Uno de los principales mecanismos de resistencia es la amplificación genómica del gen *AR*. El proceso tiene lugar en el 45%-65% de los casos de CPRC^{22,23}. El aumento en la cantidad del mRNA del *AR* transcrito como consecuencia de la amplificación del gen *AR* es el principal cambio en la progresión del CaP hacia CPRC, y es suficiente para que se presente el fenómeno de resistencia²⁴.

Mutaciones del AR: Mutaciones específicas en el AR pueden provocar que el receptor se vuelva promiscuo y sea activado no solo por sus ligandos, si no también por progestinas, estrógenos, glucocorticoides e, inclusive, algunos antagonistas del AR como la nilutamida y la bicalutamida; de igual manera el AR promiscuo puede activarse a concentraciones muy bajas de andrógenos²⁵.

Coreguladores anormales: Durante la progresión del CaP, la expresión de los coreguladores del AR se vuelve aberrante. Los coactivadores aumentan su actividad biológica y los corepresores disminuyen la suya²⁶.

Un evento que evidencia la tumorigenesis prostática, es la aparición de rearrreglos cromosómicos que generan fusiones entre los elementos regulatorios del gen *TMPRSS2* y la familia de oncogenes ETS (principalmente *ERG*)²⁷. Las fusiones *TMPRSS2-ERG* son la alteración genómica más común en CaP, que se presenta en 40%-50% de los tumores²⁸.

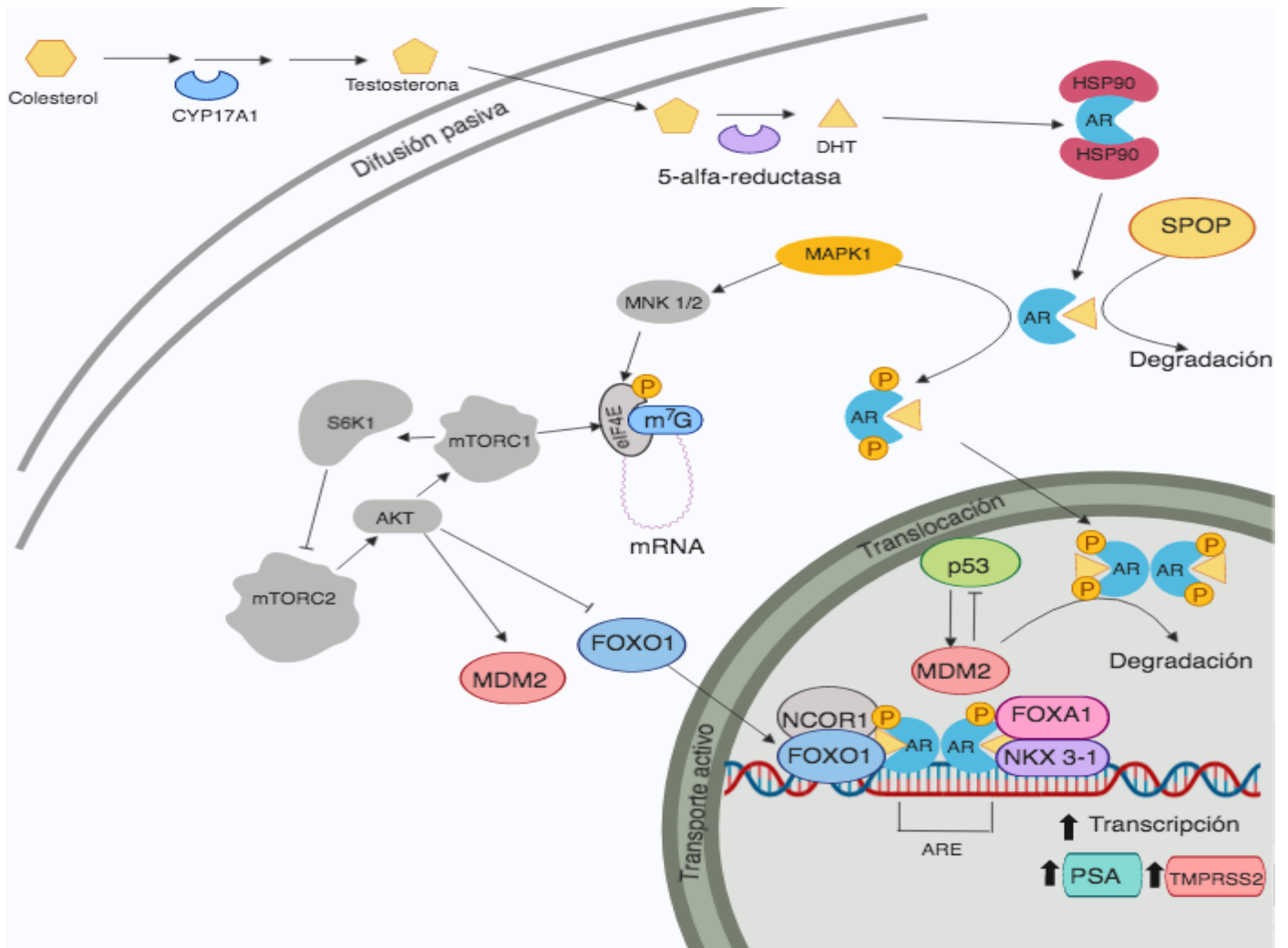


Figura 2. Mecanismo de acción del AR y su relación con los genes seleccionados. La fracción de testosterona libre en la sangre puede transportarse al interior de las células prostáticas por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, la testosterona es transformada (mediante la acción de la 5- α -reductasa) a un metabolito con mayor actividad biológica sobre el AR, la dihidrotestosterona (DHT). La DHT puede unirse al AR que se encuentra inactivo en unión a proteínas de choque térmico como la HSP90. La unión DHT-AR promueve la liberación de las proteínas de choque térmico y la fosforilación del AR mediante diversas enzimas incluyendo la MAPK1. Después de ser fosforilado, el AR se transloca al núcleo celular, en donde se dimeriza y se une al DNA en sitios específicos conocidos como elementos de respuesta a andrógenos (AREs). Dicha unión promueve el aumento de la transcripción de diversos genes que favorecen el crecimiento y la división celular, así como la expresión de algunos biomarcadores de la enfermedad como el PSA y TMPRSS2. La actividad del AR está regulada por la unión de diversas proteínas coactivadoras como FOXA1 y NKX 3-1, así como de la unión de proteínas corepresoras como NCOR1 y FOXO1. La concentración del AR dentro de la célula es regulada por las proteínas que catalizan su degradación mediante ubiquitinación, como SPOP y MDM2. Los niveles de MDM2 son regulados por p53, que puede promover la expresión de MDM2 al unirse al promotor de su gen, MDM2 a su vez inhibe la expresión de p53 formando un asa reguladora. Además de regular la actividad del AR, la fosfoproteína MAPK1 también tiene un papel regulador sobre la actividad traduccional total de la célula. Mediante la activación de MNK1/2, que a su vez activa por fosforilación al factor de traducción eIF4E, promoviendo así un aumento en la actividad traduccional de la célula⁸⁸. La activación de eIF4E también se encuentra regulada por el complejo mTORC1 vía la casacad de señalización PI3K/AKT/mTORC1/4EBP. Dependiendo de su actividad, AKT puede funcionar como un activador o como un represor de la actividad del AR, mediante fosforilación puede activar a la proteína MDM2 disminuyendo de esta manera los niveles nucleares de AR, y de igual manera puede inhibir a FOXO1 disminuyendo su actividad como corepresor de la actividad del AR.

Cáncer de próstata (CaP)

Los adenocarcinomas prostáticos son tumores malignos del epitelio glandular prostático, muestran patrones de arquitectura glandular alterados, ausencia de células basales y atipia nuclear (alargamiento del núcleo y el nucléolo)²⁹.

Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) fue el tercer tipo de cáncer mayormente diagnosticado a nivel global y la segunda causa de muerte en varones por cáncer a nivel mundial, con un número estimado de 1,276,000 nuevos casos en 2018 y 360,000 muertes en el mundo. También representó el 6.7% de las muertes por cáncer en hombres a nivel mundial con un número estimado de 358,989 fallecimientos ese mismo año³⁰. A diferencia de otros tipos de cáncer, la incidencia de CaP tiene un alto nivel de variación a nivel mundial entre distintas etnias o grupos poblacionales. Por ejemplo, existe una incidencia ajustada por edad 40 veces mayor en hombres afroamericanos (AA) de Estados Unidos, en comparación con los varones asiáticos residiendo en sus países de origen³¹ (Figura 3).

En México el cáncer de próstata fue el tipo de neoplasia con mayor incidencia y muerte en hombres, lo que representó un aproximado de 25, 049 nuevos casos en 2018 (*The Global Cancer Observatory 2019* [gco.iarc.fr]).

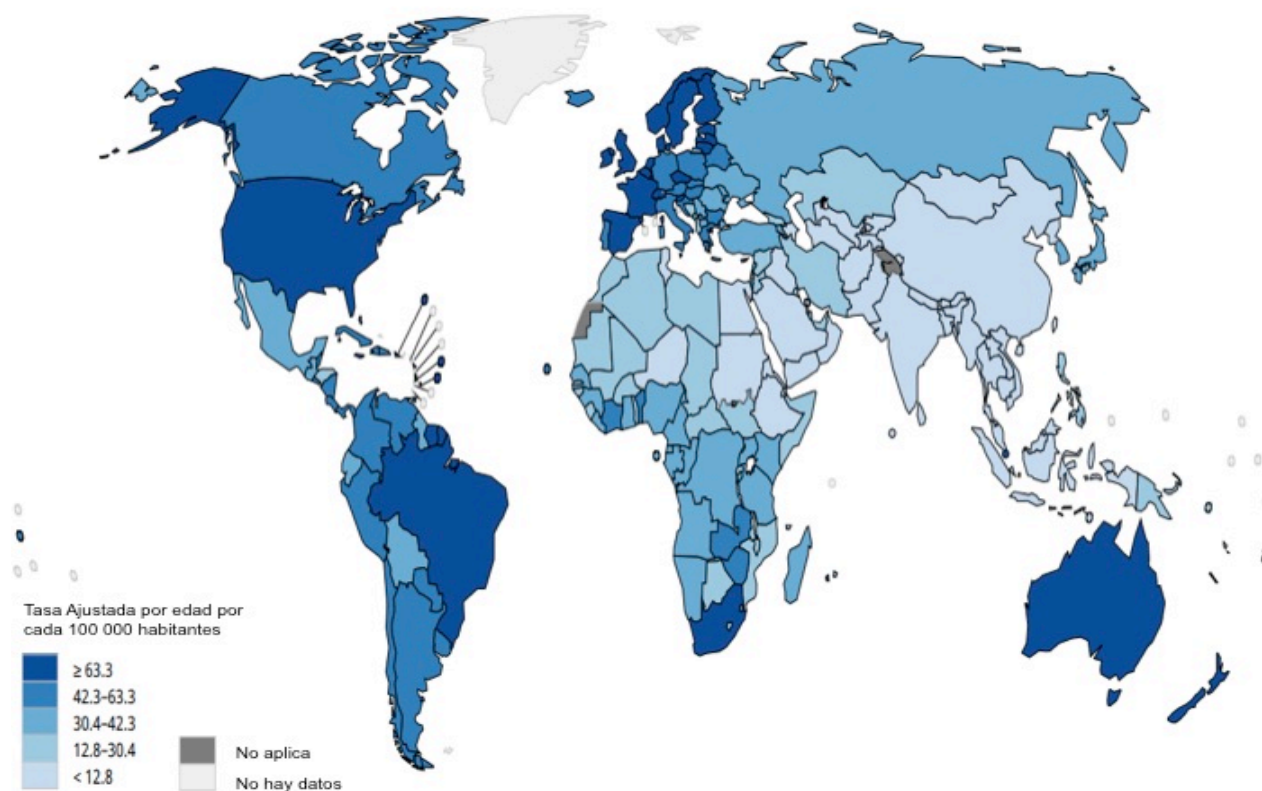


Figura 3. Incidencia ajustada por edad de cáncer de próstata a nivel mundial. Las tasas representan el número de casos por cada 100,000 habitantes. Modificada de GLOBOCAN 2018 [globocan.iarc.fr].

Diagnóstico del Cáncer de Próstata

El diagnóstico de la enfermedad se puede establecer de manera general realizando los siguientes estudios: tacto rectal, ultrasonografía, tomografía axial computarizada, resonancia magnética nuclear y el uso de marcadores séricos predictivos entre los cuales destaca el PSA.

Debido a que la mayor parte de los tumores prostáticos se localizan en la zona periférica de esta glándula, es posible detectarlos mediante el tacto rectal cuando el volumen tumoral supera los 0.2 mL. Sin embargo, únicamente el 14% de los tumores de próstata se logran detectar mediante el uso de ésta técnica como único criterio de diagnóstico³².

El nivel sérico de PSA es el criterio de escrutinio más utilizado para detectar a los pacientes con un posible diagnóstico de CaP. De manera general, se considera que una concentración sérica de PSA menor a los 4.0 ng/mL es normal, la de 4.1- 10 ng/mL se considera medianamente sospechosa y la mayor a 10 ng/mL se considera altamente sospechosa. Sin embargo, los valores de PSA también pueden tomarse como una dicotomía, en la que valores mayores a 4.0 ng/mL se consideran anormales y se recomienda una biopsia de tejido para confirmar el diagnóstico³³. A pesar de que los criterios permanecen vigentes desde su implementación a mediados de la década de 1990 hasta la actualidad, algunos autores han reportado que el desarrollo de CaP es posible para algunas poblaciones aún cuando presentan valores de PSA menores a 2.5 ng/mL³⁴. También se ha reportado un porcentaje de incidencia de CaP del 23.9% en pacientes con valores de PSA 2.1-3.0 ng/mL⁹. Por lo que a pesar de su extenso uso, el PSA difícilmente puede ser el único criterio de diagnóstico de CaP.

El análisis de biopsias de tejido prostático se considera el criterio definitivo de diagnóstico de CaP. El establecimiento de un diagnóstico histopatológico de CaP, requiere observación en el microscopio de luz de tejido seccionado y teñido con hematoxilina-eosina²⁹. Las biopsias de tejido prostático se realizan por recomendación de un urólogo después de constatar anomalías en los niveles séricos de PSA o en alguna otra técnica de detección. Debido a que el proceso de toma de muestra es altamente invasivo, puede resultar doloroso por lo que se busca evitar el diagnóstico de pacientes asintomáticos, un proceso conocido como “sobre-diagnóstico” del CaP³⁵.

Clasificación del Cáncer de Próstata

En 1992, Donald F. Gleason propuso un sistema de clasificación histopatológica del CaP que relacionaba el análisis histológico con el grado de malignidad del carcinoma. Sus observaciones separaban a los tumores pobremente diferenciados, de los moderadamente diferenciados, y estos a su vez de los altamente diferenciados. Su escala relacionó a los primeros con un progreso rápido de la enfermedad, a los segundos con un progreso intermedio de la

enfermedad y a los terceros con un progreso avanzado³⁶. Actualmente conocida como “la escala Gleason”, el sistema de clasificación sigue vigente y es la base de las clasificaciones histopatológicas modernas del CaP. Para utilizar la clasificación de Gleason se deben seleccionar dos zonas distintas de la muestra de tejido, al observarlas al microscopio se les asigna un valor en la escala del 1-5, correspondiendo el valor de 1 a un tumor bien diferenciado, el valor de 5 a uno pobremente diferenciado y los valores intermedios de 2-4 a tumores medianamente diferenciados en diferentes grados. El histopatólogo suma los valores de las dos zonas distintas del tejido y obtiene el valor que corresponde al tumor en la escala Gleason³⁶. Los resultados posibles son los siguientes:

- Gleason 2-6: Cáncer con poca agresividad y crecimiento lento.
- Gleason 7: Cáncer de agresividad y crecimiento intermedios.
- Gleason 8-10: Cáncer altamente agresivo y de mal pronóstico.

Adicionalmente, se utiliza un sistema de estadificación del CaP que permite definir la extensión del CaP, el pronóstico del paciente y la elección del tratamiento. El sistema mayormente utilizado es el TMN que fue desarrollado por la *American Joint Comitee of Cancer* [cancerstaging.org], y está basado en:

- ✓ (T); La extensión del tumor (tamaño e invasión de otros tejidos).
 - Tx = El tumor primario no puede ser evaluado.
 - T0= No hay evidencia de tumor primario.
 - Tis= Carcinoma *in situ*.
 - T1-T4= Tumor primario, a mayor número mayor tamaño.
- ✓ (N); Extensión a los nodos linfáticos.
 - NX= Los nodos regionales no pueden ser evaluados.
 - N0= No hay evidencia de invasión a los nodos linfáticos.
 - N1-N3= Evidencia de los nodos linfáticos regionales, entre mayor número mayor invasión.

- ✓ (M); Presencia de metástasis.
 - M0= No hay evidencia de metástasis.
 - M1= Evidencia de metástasis distante.

En cuanto más elevado sea el estadio de la enfermedad, peor será el pronóstico.

Factores de riesgo

El CaP es una enfermedad compleja con una etiología multifactorial. Diversos estudios han intentado relacionar el desarrollo de CaP con factores ambientales y de estilo de vida. Se han reportado a las dietas altas en grasas y en carnes rojas procesadas como posible factor de riesgo de la enfermedad³⁷. Igualmente, el consumo de tabaco ha sido estudiado como posible factor de riesgo ya que pudiera contribuir al desarrollo tumoral mediante la acción de los carcinógenos contenidos en el tabaco, que potencialmente podrían promover cambios en los niveles de testosterona³⁸. La obesidad también se ha propuesto como potencial factor de riesgo de CaP. Se ha reportado que 5kg/m² de aumento en el índice de masa corporal, incrementa en un 20% el riesgo de muerte por CaP³⁹. Sin embargo la evidencia proporcionada a la fecha no ha sido lo suficientemente fuerte para relacionar de manera clara a estos factores con el desarrollo de CaP. Es más probable que la asociación de dichos factores con la enfermedad sea diferente dependiendo de las características clínicas de la enfermedad⁴⁰. Por otra parte, estudios consideran que la proporción de CaP que puede ser explicada por factores de riesgo ambientales es una de las más bajas en todos los tipos de cáncer⁴¹.

Al día de hoy, los únicos factores de riesgo que han sido clara y consistentemente establecidos son: edad, etnia, historia familiar y variantes génicas de riesgo. A continuación, se muestran a detalle las evidencias de cada uno.

Edad

El CaP es una enfermedad poco frecuente en varones menores de cuarenta años de edad. La incidencia de CaP aumenta de manera dramática después de los 55 años de edad, y el riesgo aumenta sustancialmente cada década transcurrida, siguiendo una tendencia similar a la de otros tipos de cáncer. Ésta tendencia al aumento de la incidencia con respecto al incremento de la edad, es notable a nivel global sin importar si las regiones del mundo donde se presentó son altamente o pobremente desarrolladas⁴².

Grupo étnico

El CaP es el tipo de cáncer que más se ve influenciado por la etnia o fondo genético poblacional. Así, existen diferencias verdaderamente notables en la incidencia y mortalidad por CaP entre varones de los diferentes grupos étnicos que han sido estudiados, básicamente de ascendencia asiática, de ascendencia europea (caucásicos) y de ascendencia africana. Se ha observado que hombres de origen asiático tienen una prevalencia de CaP del 50% a la edad de 90 años, mientras los hombres de ascendencia europea occidental tienen el mismo porcentaje de incidencia a la edad de 80 años. En agudo contraste, los de origen afro-americano (AA) tienen la misma prevalencia a la edad de 60 años⁴³.

Se ha reportado que prácticamente en cualquier etapa del desarrollo de CaP y para prácticamente cualquier edad, la presencia de esta enfermedad es más común en hombres AA que en hombres de origen Europeo-Americano (EA). Debido a que ambas poblaciones de estudio se encuentran en el mismo país, se ha especulado que ésta marcada disparidad puede tener un componente biológico⁴⁴. Datos del programa estadounidense SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Result Programs*) colectados del 2008-2012, revelaron diferencias en incidencias ajustadas por edad por cada 100,000 hombres. Los individuos de origen asiático presentaron el valor más bajo con incidencia de 74 casos, seguidos de los de ascendencia hispánica que presentaron incidencia promedio de 114.7. Por su parte, la población de origen EA tuvo incidencia promedio de 133.4, y por

último la población de origen AA presentó incidencia de 214.5, siendo la más elevada de todas las etnias estudiadas [seer.cancer.gov].

Un estudio realizado en 8,000 individuos con ascendencia africana residentes en Estados Unidos y en el Reino Unido, encontró que muchos de los *loci* que habían sido reportados como de susceptibilidad a CaP para poblaciones de origen Europeo y Asiáticas, no fueron encontrados en su población de estudio⁴⁵.

Para estudiar el papel de las distintas etnias en la predisposición y desarrollo de ciertas patologías, se suele separar a los individuos para su estudio en grupos étnicos generalizados (Afro-descendientes, hispano-descendientes, euro-descendientes, etc.). Sin embargo, la mayoría de los grupos étnicos, representan poblaciones genéticamente mixtas (*admixed populations*, en inglés), en las que los individuos muestran diversos tipos y también grados distintos de ancestría. Por ello, las categorías en las que se clasifican a ciertos individuos, solo pueden reflejar una parte de la complicada mezcla de ancestrías que estos individuos representan. Dicho de otra forma, los grupos étnicos generalizados no pueden capturar la contribución específica de las poblaciones ancestrales⁴⁶. Esto es particularmente cierto para las poblaciones de origen africano e hispánico⁴⁴. Un estudio realizado en una población auto-identificada como afroamericana, reveló que los pacientes con mayor grado de ancestría de África occidental, eran mayormente propensos a desarrollar CaP, aún presentando valores séricos de PSA menores a 4.0 ng/mL, con respecto a los pacientes con un menor grado de ancestría africana-occidental⁴⁷. Además, se ha encontrado que la prevalencia de CaP detectada por escrutinios de PSA en varones ghaneses, es mayor que la reportada en cualquier población AA en Estados Unidos⁴⁸. Éstos resultados sugieren que el genoma ancestral proveniente de África occidental contiene alelos de riesgo para CaP que son comunes en los individuos con dicha ancestría.

Algunos estudios han propuesto que, además de el fondo genético étnico, la alta incidencia de CaP de algunas poblaciones en particular también está relacionada con aspectos socioeconómicos que se traducen en diversos niveles de calidad en atención a la salud. Otros estudios han reportado que la calidad de la atención médica proporcionada a los Hispánicos y AA, es diferente a la recibida

por los EA, lo cual podría afectar en los resultados del tratamiento⁴⁹. Sin embargo, existen reportes de la persistencia en la disparidad de resultados aun cuando hombres de distintas etnias tienen el mismo nivel socioeconómica y de atención médica^{50,51}. Como se mencionó antes, la gran mayoría de estudios moleculares para el CaP se han hecho en solo tres poblaciones distintas, de origen africano, asiático o europeo. Estudios similares en otras poblaciones, como los de origen hispano y los distintos pueblos originarios de todos los continentes son escasos o nulos. Por ello, la información disponible al momento no es suficiente para determinar si las diferencias en incidencia y respuesta al tratamiento entre diferentes grupos étnicos podría eliminarse homogenizando el tipo de tratamiento para todos los casos.

Historia familiar

Diversos estudios, realizados principalmente en poblaciones nórdicas-europeas, han demostrado que el CaP es uno de los tipos de cáncer con un mayor componente hereditario^{52,53}. Los varones con un familiar cercano (padre o hermano) diagnosticado con CaP, tienen hasta tres veces mayor riesgo de desarrollar CaP en comparación con un individuo sin familiares cercanos que la hayan presentado⁵⁴. De igual manera, los hombres con un familiar cercano diagnosticado con CaP presentan el doble de probabilidad de morir por esta causa que los hombres sin antecedentes familiares directos de la enfermedad⁵⁵. A pesar de que ésta clara tendencia es un factor considerable en el desarrollo de CaP, el aislamiento y la identificación de las variantes génicas responsables de dicho componente hereditario han aún son limitados.

La mayoría de los genes relevantes para el inicio y desarrollo del CaP que se han identificado al momento se han encontrado en poblaciones de origen europeo. Los genes mas importantes son *AR*, *HOXB13*, *HPC1*, *PCAP*, *TP53*, y otros más^{56,57}. Estudios realizados en familias de poblaciones AA han identificado distintos *loci* de susceptibilidad a CaP que confirman algunas asociaciones ya encontradas en poblaciones de origen europeo. Por ello, se puede decir que algunos de los *loci* relacionados a la herencia familiar han sido validados entre

diferentes grupos étnicos^{58,59}. Es importante mencionar que la mayoría de los *loci* y las variantes germinales que se han encontrado no presentan asociaciones con cáncer de estadios avanzados, lo que sugiere que el componente hereditario pudiera jugar un papel importante en la carcinogénesis temprana^{60,61}.

Variantes de riesgo

En épocas recientes, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome-wide association studies*), capaces de genotipificar cientos de miles de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs, por sus siglas en inglés *Single nucleotide polymorphism*) distintos en un gran número de muestras, han proporcionado información acerca de las diversas variantes genéticas que pueden generar una predisposición al desarrollo de CaP. En poblaciones con ancestría étnicamente diversa (como las poblaciones hispanoamericanas y AA), se han encontrado más de 180 *loci* de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Algunos estudios proponen que dichas variantes pueden explicar ~30% del riesgo familiar de la enfermedad^{62,63}.

Utilizando la misma técnica se ha encontrado que ciertos mecanismos moleculares se ven más afectados que otros en el CaP. Los mecanismos moleculares mayormente afectados en son: adhesión celular; remodelamiento de la matriz extracelular; regulación transcripcional mediante la vía del AR; vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF por sus siglas en inglés, *fibroblast growth factor*) y la vía del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I por sus siglas en inglés *Insuline Like Growth Factor I*)⁶².

Estos estudios también han logrado evidenciar mutaciones en genes específicos relacionados con el riesgo de desarrollar CaP. Algunos de ellos son los siguientes; *MMP7*, gen relacionado al metabolismo de metales pesados mediante el uso de metaloproteasas; *RAD51B*, gen involucrado en la reparación de rupturas de doble cadena en el DNA genómico; *HOXB13*, cuyo producto proteico es importante para el desarrollo normal de la próstata; *SPOP*, importante en la vía canónica del AR; adicionalmente se han reportado SNPs de riesgo en *TP53*, gen que codifica la proteína supresora de tumor p53; *BRCAMD4*, gen

regulador de la actividad de p53; *BRCA1/2*, cuyas mutaciones en línea germinal han sido asociadas con CaP agresivo^{64,62,65}.

Las mutaciones en el AR son poco comunes en los estadios tempranos de CaP, pero muy frecuentes en etapas avanzadas de la enfermedad. Las mutaciones en AR se presentan en el 50% de los CPRC, lo cual sugiere que surgen como un mecanismo de resistencia al tratamiento hormonal⁶⁶.

Modelo de predisposición genética

A pesar de los descubrimientos realizados por los estudios GWAS, el componente heredable del CaP no ha podido describirse por completo. Esto se debe a que el modelo de predisposición genética de CaP más aceptado al momento es el modelo poligénico, que involucra a las variantes de riesgo comunes (detectadas mediante GWAS), de baja penetrancia y de variantes raras de alta penetrancia (detectadas mediante estudios prediseñados y técnicas de secuenciación masiva)⁶⁷.

Lo anterior puede explicarse por un fundamento técnico de las dos estrategias mencionadas. Mediante el uso de GWAS solamente se pueden descubrir variantes comunes que tengan frecuencia mayor al 5% en la población de estudio. Mientras que los estudios prediseñados de casos y controles, que utilizan técnicas de secuenciación masiva, son capaces de encontrar variantes raras (poco frecuentes) presentes en la población de estudio⁶⁷.

Un alelo de riesgo común confiere por sí solo una baja susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Sin embargo, al estar presentes varios alelos, el riesgo se multiplica^{62,68}.

JUSTIFICACIÓN

La gran mayoría de estudios sobre las causas genéticas del CaP se han hecho en solo tres tipos de población, de origen africano, asiático o europeo. Tales investigaciones han establecido que el fondo genético poblacional tiene un impacto significativo en el inicio y desarrollo de esta neoplasia, por lo menos para estas tres poblaciones. Sin embargo, estudios similares en otras poblaciones, como hispanos y los distintos pueblos originarios de todos los continentes, son escasos o nulos. Por ello, es necesario estudiar cuál es fondo genético en el desarrollo del CaP en varones mexicanos y analizar su impacto en el desarrollo de esta neoplasia.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles serán las mutaciones en genes relevantes al CaP que se encontrarán en muestras tumorales dentro de una población de origen mexicano?

HIPÓTESIS

- Las muestras tumorales presentarán mutaciones nuevas, no reportadas en otros estudios.
- Los genes relacionados directamente a la vía de señalización del AR presentarán mayor número de mutaciones.

OBJETIVO

Identificar mutaciones en genes relacionados a la vía canónica de señalización del AR relevantes para el CaP presentes en tumores muestras tumorales de pacientes mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar un panel de genes relevantes para CaP en la vía del AR.
- Describir las mutaciones presentes en pacientes mexicanos con cáncer de próstata y en individuos mexicanos sin cáncer de próstata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas

La recolección de biopsias se realizó de acuerdo al protocolo ético del Instituto Nacional de Cancerología “Identificación de nuevas mutaciones en el receptor de andrógenos específicas de población mexicana y su impacto clínico en cáncer de próstata”, así como su Consentimiento Informado (014/019/IBI) y (CEI/905) (Anexo 2). La recolección se realizó en la Clínica de Urología en el Instituto Nacional de Cancerología.

Se recolectó tejido prostático de varones mexicanos con valores de PSA sérico superiores al rango normal (mayores a 4 ng/mL), y que presentaban síntomas relacionados con alguna patología prostática tales como disuria, hematuria, tacto rectal sospechoso entre otros. Los pacientes se encontraban en un rango de edades de 41-83 años al momento de la recolección. Los pacientes no tuvieron un tratamiento con algún antagonista androgénico previo. Dichas muestras de tejido prostático fueron posteriormente clasificadas como tumorales y no tumorales después de un diagnóstico patológico.

Extracción de DNA genómico

A partir de las muestras de tejido fresco prostático no incluido en parafina (tumorales y no tumorales), se extrajo ADN genómico de acuerdo al protocolo del kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* de Promega.

Diseño del panel

El análisis de los genes seleccionados en esta tesis se realizó por secuenciación masiva de siguiente generación en un secuenciador *Ion Torrent S5*, manufacturado por *Thermo Fisher Scientific*. De modo que el diseño experimental que a continuación se describe fue para realizar la metodología recomendada por el fabricante.

Se realizó una búsqueda informática en PubMed [ncbi.nlm.nih.gov/pubmed], de genes reportados como mutados en y asociados clínicamente al CaP, en diferentes poblaciones y que guardaran una relación con la vía canónica del AR. La búsqueda se realizó utilizando palabras clave como: “*Androgen Receptor*”, “*mutation database*”, “*Prostate cancer*”, “*Androgen Receptor pathway*”, entre otras.

Después de realizar la búsqueda informática, se seleccionó un panel de 15 genes que de acuerdo a diversos reportes han demostrado tener una asociación relevante con CaP en distintas poblaciones. Además, se buscó que el producto proteico de dichos genes tuviera una relación funcional con la vía canónica del AR (ver Tabla 2). Se diseñó el panel de genes a secuenciar utilizando la herramienta “*Ion AmpliSeq Designer*” de *Thermo Fisher Scientific*. El panel se diseñó con respecto al genoma de referencia hg38. El diseño se realizó para utilizarse en DNA estándar (275 pb), únicamente para la región codificante (CDS por sus siglas en inglés, *coding DNA sequence*), con 15 genes como blanco, un tamaño del blanco de 57.32 kb, un número de 305 amplicones, dos *pools* de *primers* y una cobertura del 97.73%.

Pasos para realizar el panel personalizado:

- 1) Iniciar sesión.
- 2) Seleccionar: *Start a New Design*.
- 3) Seleccionar sucesivamente: *Made to order* ⇒ *Create from Genes* ⇒ *Regions or Amplicons*.
- 4) Seleccionar: *Amplification type = DNA Gene designs (multi-pool)*
- 5) Seleccionar: *Add targets*
- 6) Añadir los blancos utilizando los nombres abreviados de cada gen.
- 7) Seleccionar: *Submit targets*
- 8) Esperar a que la aplicación devuelva los parámetros calculados.

El panel diseñado tuvo un tamaño de 57.32 Kb. Una cobertura promedio de 97.73%. Un número total de 305 amplicones y un tamaño de amplicón en el rango entre 125-275 pb.

Cuantificación del DNA genómico

Se realizó la cuantificación del DNA genómico proveniente de las muestras de tejido colectadas. La cuantificación es un paso crucial en la elaboración de las librerías, ya que el equipo se encuentra estandarizado para trabajar con una cantidad específica de DNA estándar. La cuantificación se realizó mediante la elaboración de una curva estándar para reacciones de PCR de tiempo real, siguiendo el protocolo y condiciones de reacción establecidas en el manual *Demonstrated Protocol; Sample Quantification for Ion AmpliSeq™ Library Preparation Using the TaqMan® RNase P Detection Reagents kit*. Este se encuentra disponible en la página thermofisher.com (Publicación número: MAN0007732).

Preparación de las bibliotecas

La elaboración automatizada de las bibliotecas se realizó utilizando el kit *Ion AmpliSeq Kit for Chef DL8™*. Cada kit permite realizar una biblioteca con ocho muestras diferentes. Se elaboraron 12 bibliotecas diferentes, sumando un total de 96 muestras, procesadas con el instrumento *Ion Chef™*. Se siguió el protocolo del manual *Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System*. El cual se encuentra disponible en la página thermofisher.com (Publicación número: MAN0013432).

Siguiendo dicho protocolo, se diluyó cada muestra de DNA genómico a una concentración de 0.67 ng/uL, utilizando agua libre de DNAsas. Se cargaron 15 uL de dicha dilución, por cada muestra en los cartuchos correspondientes, cargando así 10 ng de DNA genómico por muestra.

Se añadieron al cartucho correspondiente, 150 uL de *pool de primers 1 y 2* por cada corrida, ambos a la concentración de 2x. Cada uno se vortexeo y centrifugó antes de ser agregado al cartucho. Los primers se añadieron siguiendo las

indicaciones del apartado *Chef-ready panels* del manual. Antes de cargar los cartuchos se revisaron para evitar la presencia de burbujas.

Se cargaron los cartuchos y consumibles siguiendo las indicaciones del manual. Se programaron las corridas seleccionando la opción *Step by step* del menú de IonChef y seleccionando el programa *AmpliSeq*. Las condiciones del *workflow* seleccionadas fueron las siguientes:

- ✓ # of primer pools: 2
- ✓ Target amplification cycles: 18
- ✓ Anneal & extension time: 4 minutes

Una vez seleccionado el *workflow* adecuado se comenzó la corrida. Cada corrida tuvo una duración aproximada de 6 horas. Una vez concluida la corrida, se descargaron los cartuchos y consumibles del equipo, de acuerdo a lo señalado en el manual. Al descargar se descartaron todos los consumibles excepto la caja de puntas usadas, que debe desecharse en un contenedor especial por los residuos de reacción que contiene. Las bibliotecas pueden guardarse a 4° C hasta por un mes, pero si se requiere guardar por un tiempo mayor se deben almacenar a -20°C. Las bibliotecas deben permanecer a la concentración de ~ 100 pM antes de ser secuenciadas. Si han permanecido almacenadas por un periodo largo de tiempo se recomienda cuantificarlas utilizando algún equipo de cuantificación por fluorometría como *Qubit™ 3.0 Fluorometer*. Si se requiere hacer una transformación de concentración en ng/μL a pM utilizar los siguientes factores de conversión:

$$(\text{Concentración en ng/}\mu\text{L}) \times 6.061 = \text{Concentración en nM}$$

$$(\text{Concentración en nM}) / 1,000 = \text{Concentración en pM}$$

Secuenciación de las bibliotecas

La preparación de los chips de secuenciación y la secuenciación de los mismos se realizaron utilizando el kit Ion 540™ Kit – Chef (Catálogo Número: A30011), y el chip Ion 540™ Chip. La secuenciación se realizó en un equipo de secuenciación masiva *Ion Torrent S5*, de *Thermo Fischer Scientific*. El proceso se realizó siguiendo el protocolo del manual Ion 540™ Kit – Chef USER GUIDE, que se encuentra disponible en la página thermofisher.com (publicación número: MAN0010851). Se descongelaron y colocaron los reactivos, así como los consumibles en el IonChef siguiendo el protocolo del manual. Se añadieron 25 µL de cada biblioteca a una concentración ~100 pM. Se pueden preparar mezclas de las biblioteca para cargarlas al equipo, siempre y cuando la concentración final de cada biblioteca sea ~100 pM. Se cargaron máximo 4 bibliotecas por cada chip (recomendado) y un mínimo de 2 bibliotecas en un chip. Se añadieron los reactivos y se cargaron los consumibles de acuerdo a lo indicado en el manual, se utilizó un chip por corrida.

Las corridas de secuenciación se programaron utilizando la opción *step by step*, del IonChef y seleccionando la opción *Prepare Chip*. Al concluir las corridas se desmontaron los reactivos y los consumibles del IonChef siguiendo las instrucciones del manual, teniendo especial cuidado al remover el líquido residual del chip. Se realizó la secuencia de iniciación para el secuenciador *Ion Torrent S5™* siguiendo el protocolo del manual, en cada corrida, se vació el recipiente de los desechos y se cambió la solución W2, la solución de limpieza Ion S5™ *Cleaning Solution*, se cambió aproximadamente cada tres corridas. Después del proceso de iniciación se programó la corrida de secuenciación siguiendo el protocolo del manual utilizando 500 flujos por corrida. Al final de cada corrida se programó un ciclo de limpieza del equipo. Las corridas tuvieron una eficiencia de cargado promedio de 91%. El porcentaje de perlas policlonales que se obtuvo por corrida fue menor al 20%.

Descarga de resultados

Una vez concluida cada corrida de secuenciación, se revisaron los reportes preliminares de la corrida. La revisión se realizó en un equipo conectado al *IonTorrent Server* del secuenciador. Se descargaron los archivos con extensión “.xls” y “.vcf” de cada corrida realizada.

Se elaboró una base de datos con información de todos los archivos .xls. La cual contiene las siguientes categorías: #locus, tipo de mutación, referencia, genotipo, cobertura, gen, localización, función, cambio en la proteína, cambio en el codón, *polyphen score*, dbsnp y muestra. Utilizando la información de la base de datos mencionada se elaboraron las figuras del presente trabajo.

Procesamiento de resultados

Se separaron las mutaciones exónicas con algún efecto en el producto proteico (*missense, nonssense, frameshift insertion, frameshift deletion*) de las mutaciones exónicas sinónimas y de las mutaciones intrónicas. Se separaron las mutaciones exónicas en dos grupos dependiendo del tipo de muestra del que se obtuvo la secuencia: “Tumorales” y “No Tumorales”.

Se elaboró una base de datos clínicos (Tabla 1) con la información de cada paciente con las siguientes categorías: ID (Número de identificación), N° de expediente en el Instituto Nacional de Cancerología (INCaN), nombre del paciente, fecha de nacimiento, edad, índice de masa corporal, adicciones, nivel de PSA, grado histopatológico Gleason, clasificación TNM, invasión perineural.

RESULTADOS

Comparación de variables clínicas en ambos grupos

En la Tabla 1, se muestra una comparación entre las principales variables clínicas de los dos grupos de estudio del presente trabajo. Los parámetros comparables que se utilizaron para estudiar a las dos poblaciones fueron: edad, valores séricos de PSA al momento de la toma de muestra para el diagnóstico, índice de masa corporal.

El resto de los parámetros utilizados en la Tabla 1, al ser parámetros exclusivos de las muestras tumorales, se utilizaron para poder describir de manera global al grupo de estudio clasificado como tumoral. Dichos parámetros fueron: Adicciones reconocidas por los pacientes, valor en la escala Gleason (*Gleason score*), presencia de invasión perineural y presencia de metástasis.

Tabla 1. Comparación de variables clínicas entre los dos grupos de estudio y descripción de las variables clínicas de pacientes con diagnóstico de CaP.

Variable clínica	Muestras tumorales N (%)	Muestras no tumorales N (%)
Edad	≤ 50 3(4.8%) > 50 60(95.2%) Mediana = 68 años	≤ 50 2(6.3%) > 50 30(93.7%) Mediana = 67 años
PSA al momento del diagnóstico	≤ 10 ng/mL 11(17.5%) 10.1-20 ng/mL 11(17.5%) > 20 ng/mL 41(65%) Mediana = 305 ng/mL	≤ 10 ng/mL 18(56.3%) 10.1-20ng/mL 11(34.4%) > 20 ng/mL 3(9.4%) Mediana = 10.5 ng/mL
Índice de masa corporal	< 18.5 2(4.1%) 18.5-24.9 10(20.4%) 25-29.9 26(53.1%) ≥ 30 11(22.4%) Mediana = 27	< 18.5 0(0%) 18.5-24.9 4(66.6%) 25-29.9 1(16.7%) ≥ 30 1(16.7%) Mediana = 25.9
Adicciones	Fumadores: 4(7.4%) Bebedores: 11(20.4%) de alcohol Fumadores y bebedores de alcohol: 22(40.7%)	Datos no disponibles
Valor en la escala Gleason	< 7 6 (9.7%) $=7$ 25(40.3%) >7 31(50%)	Datos no disponibles
Invasión perineural	Sí 41(74.5%) No 15(25.5%)	Datos no disponibles
Metastasis	Sí 19(38%) No 31(62%)	Datos no disponibles

Panel de genes seleccionados

A continuación, se muestra el panel con los genes seleccionados para el presente estudio, adicionalmente se hace una breve descripción de su función y relevancia en CaP, así como algunas mutaciones destacadas reportadas en otros estudios.

Tabla 2: Panel de genes seleccionados para el estudio.

Gen seleccionado	Función y reportes
AR	<i>Androgen Receptor</i> . Su producto proteico es un factor de transcripción activado por andrógenos, es responsable del mantenimiento y desarrollo normal del tejido prostático. Se han reportado mutaciones en éste gen que surgen como respuesta a diversos tratamientos. Por ejemplo, la mutación p.T878A provee resistencia al tratamiento con Flutamida, la mutación p.W742C provee resistencia al tratamiento con Bicalutamida, mientras que la mutación p.L702H provee resistencia al tratamiento con glucocorticoides ²¹ . Las mutaciones en el AR son comunes en los CaP de estadios avanzados ⁶⁶ .
TP53	Codifica para la proteína p53. Es un factor de transcripción implicado en diversas vías de reparación del DNA y paro del ciclo celular. Forma un <i>loop</i> de regulación con la proteína MDM2, en el que ambas proteínas regulan directamente los niveles de la otra ⁶⁹ (Figura2). Las mutaciones en TP53 aumentan conforme progresa la enfermedad, se han reportado incidencias de hasta el 53% en pacientes con CaP ²¹ .
MTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> . Su producto proteico es una cinasa pleiotrópica (reguladora del crecimiento celular, inmunidad y metabolismo celular), es mayormente reconocida por regular la actividad de I4E y con esto, la actividad traduccional de la célula. El producto proteico de MTOR también regula los niveles de MDM2 y FOXO1. El aumento en la actividad de mTOR puede promover el crecimiento tumoral y el progreso de la enfermedad mediante diferentes mecanismos ⁷⁰ . Se ha reportado que la resistencia al tratamiento con Bicalutamida está relacionada con la activación de mTOR ⁷¹ . Se ha reportado que el 40% de los CaPs primarios y cerca del 70% de los metastásicos, presentan alguna mutación en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR ²² .
CYP17A1	Codifica para la enzima CYP17A1, crucial en el proceso de transformación de colesterol a testosterona (Figura 1). Se ha observado una sobreexpresión de CYP17A1 de hasta 10 veces en células de CaP metastásico ⁷² . Las células cancerosas expresan CYP17A1 intratumoralmente, por lo cual se utilizan inhibidores de ésta enzima como tratamiento de CPRC. Después de un periodo de tiempo, las células cancerosas pueden mostrar resistencia al tratamiento ⁷³ .
SRD5A2	Su producto proteico, la enzima 5- α -reductasa, es la encargada de la transformación de la testosterona en DHT (Figura 2), las mutaciones en éste gen pueden causar el desarrollo del síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (CAIS) ⁷⁴ , se ha demostrado que la transición

	de tejido benigno hacia CaP avanzado y CPRC está asociada con la pérdida en la actividad de SRD5A2 ⁷⁵ . Estudios han demostrado asociaciones entre algunos polimorfismos del gen y riesgo de desarrollo de CaP en algunas poblaciones. Por ejemplo, el polimorfismo p.V89L se ha asociado con riesgo de desarrollo de CaP en poblaciones de origen latinoamericano y AA ⁷⁶ .
MAPK1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i> . También conocido como <i>E3 ubiquitin-protein ligase</i> . Su producto proteico, una cinasa involucrada en cascadas de regulación, pueden promover el crecimiento celular. Fosforila al AR favoreciendo su translocación al núcleo (Fig. 2). Se ha reportado que hasta el 25% de los tumores primarios de CaP presentan mutaciones en la vía de MAPK ⁷⁷ . MAPK es capaz de aumentar la actividad de mTOR ⁷⁰ .
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i> . Ubiquitina ligasa que promueve la degradación del AR. Inhibe la actividad de p53, la cual regula a su vez, la actividad de MDM2 ⁶⁹ (Figura 2). La pérdida de MDM2 promueve la expresión del AR en células troncales prostáticas ¹⁸ .
SPOP	Speckle Type BTB/POZ Protein. Ubiquitina ligasa que promueve la degradación del AR. <i>SPOP</i> es uno de los genes mayormente mutados en CaP en diversas poblaciones, con incidencias de hasta el 15% ⁷⁸ . Se ha propuesto que <i>SPOP</i> puede presentar mutaciones germinales de predisposición para la enfermedad ⁶² . En tumores con mutaciones en <i>SPOP</i> no se encontró la fusión de genes más abundante en CaP <i>TMPRSS2:ERG</i> ⁷⁹ . Se ha reportado que mutaciones en <i>SPOP</i> asociadas a CaP, generan un fenotipo proteico incapaz de degradar al AR ¹⁷ .
HSP90AA1	<i>Heat Shock Protein 90 AA1</i> . Codifica para la proteína de choque térmico HSP90, principal chaperona asociada al AR en citoplasma. HSP90 le permite al AR estar en la conformación adecuada para interactuar con su ligando (Figura 2). Inhibidores de la proteína han logrado disminuir la expresión de una variante del AR implicada en el desarrollo de CaP ⁸⁰ .
FOXO1	<i>Forkhead Box O1</i> . Corepresor de la actividad del AR. Inhibe la unión del receptor con el DNA (Fig 2). La expresión citoplasmática de FOXO1 fosforilado está correlacionada con progresión de CaP. Se ha reportado que el 30% de líneas celulares de CaP, así como tumores de CaP primarios, tienen deletado el locus donde se encuentra el gen <i>FOXO1</i> ⁸¹ .
NCOR1	<i>Nuclear Receptor Corepressor 1</i> . Corepresor indirecto de la actividad del AR, une a otras proteínas corepresoras que interactúan directamente con el AR (Fig. 2). Se han reportado mutaciones puntuales en muestras de CPRC ²³
FOXA1	Forkhead box protein A1. Su producto proteico es un coactivador directo del AR (Fig. 2). Diversos estudios han demostrado mutaciones recurrentes en <i>FOXA1</i> (~4% de los casos) en CaP, principalmente en el dominio conocido como <i>Forkhead domain</i> . Las mutaciones promueven el crecimiento tumoral y afectan la vía de señalización del AR ^{82,23} .
NKx3.1	<i>NK3 Homeobox 1</i> . Factor de transcripción involucrado en el desarrollo normal y la proliferación adecuada de las células del epitelio prostático. Es un activador del AR, el cual a su vez regula a NKX3-1 (Fig. 2). NKX3-1 colabora con AR y FOXA1, para mediar la expresión de genes que promueven la supervivencia celular en CaP avanzado y recurrente ⁸³ . El papel de NKX3-1 en el desarrollo de CaP es controversial, ya que se ha demostrado que una de las alteraciones más comunes en CaP es la

	pérdida del gen ⁸⁴ . Por lo que se cree que pudiera tener un papel tanto de gen supresor de tumor, como de oncogen.
<i>TMPRSS2</i>	<i>Transmembrane protease serine 2</i> . Codifica para una serina proteasa trans-membranal, su función biológica aún es desconocida, y su expresión se ve regulada por la acción del AR (Figura 2). La fusión de éste gen con el oncogen <i>ERG</i> , es la de mayor prevalencia en CaP (~50% de los casos) ²² . La presencia de la fusión es un indicador de que han existido rearrreglos cromosómicos dentro de la célula y suele interpretarse como un marcador de etapas tempranas de CaP ⁸⁵ .
<i>eIF4E</i>	<i>Eukaryotic Initiation Factor 4E</i> . Factor de inicio de la traducción en eucariontes. Reconoce el <i>cap</i> presente en el extremo 5' de los mRNAs. Es uno de los principales reguladores de la actividad traduccional de la célula (Figura 2). Los niveles elevados de eIF4E inducen el fenotipo maligno en modelos celulares, esto es debido al aumento de la expresión de proteínas oncogénicas reguladas por eIF4E ^{86,87} . Cuando se encuentra hiperfosforilada, eIF4E favorece la transformación de las células normales a un fenotipo maligno ⁸⁸ . Su hiperfosforilación está directamente implicada en promover el desarrollo de Cap ⁸⁸ .

Muestras secuenciadas

De acuerdo con el diagnóstico patológico, las muestras secuenciadas se dividieron en dos grupos: "Tumorales" y "No Tumorales". Un total de 96 muestras de tejido prostático fueron secuenciadas, 64 de ellas fueron clasificadas como "Tumorales", mientras que las 32 restantes fueron clasificadas como "No Tumorales". Los análisis de las secuencias obtenidas y las mutaciones descritas fueron descubiertas utilizando como referencia el genoma humano GRCh38. El total de las muestras fueron secuenciadas con una profundidad promedio de 6735X.

Número de mutaciones encontradas

El número de mutaciones que presentó cada gen en ambos grupos fue cuantificado. Las mutaciones consideradas en este trabajo pertenecen a cuatro clasificaciones distintas; *missense*, mutación puntual que sustituye un aminoácido por otro aminoácido no redundante en el producto proteico del gen; *nonsense*, mutaciones que introducen un codón de paro prematuro, generando una proteína trunca; *frameshift deletion*, corrimientos en el marco de lectura por la presencia de una deleción; *frameshift insertion*, corrimientos en el marco de lectura por alguna inserción.

En la figura 4 se muestra el número de muestras que presentaron mutaciones de cualquier grupo y se compara la frecuencia entre ambos grupos, se puede observar que los genes con un mayor número de muestras mutadas son: *TP53*, *AR* y *FOXO1*.

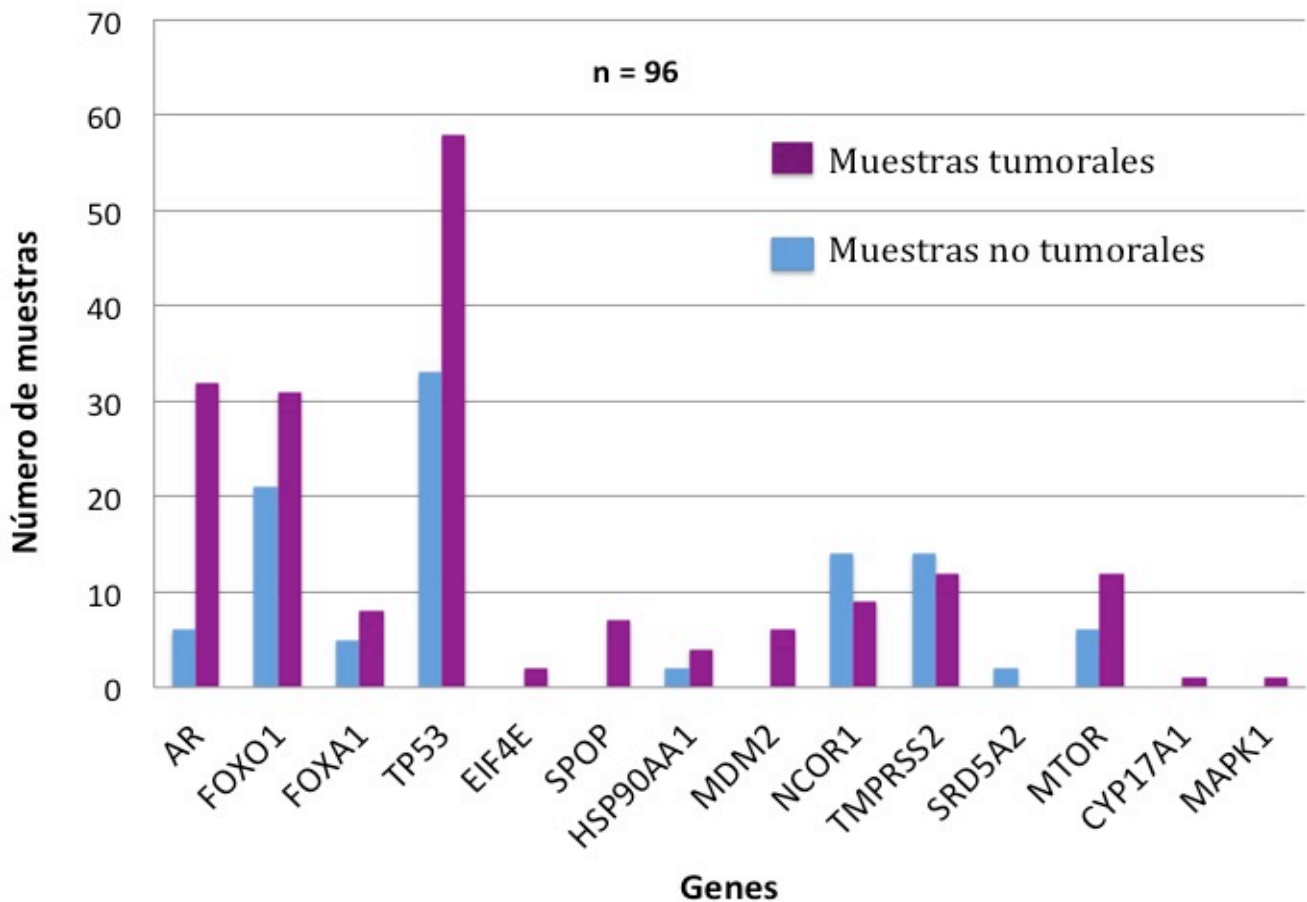


Figura 4. Número de muestras tumorales y no tumorales con variantes funcionales por gen. Comparación gráfica del número de variantes presentes entre los grupos de muestras “tumorales” y “no tumorales” por cada gen secuenciado. Las variantes cuantificadas engloban los cuatro tipos de variantes funcionales encontradas en las muestras: *missense*, *nonsense*, *frameshift deletion* y *frameshift insertion*.

Tipos de variantes encontradas en muestras tumorales

El porcentaje de muestras mutadas presentes se calculó en el grupo de muestras “tumorales”. El gen que presentó mayor porcentaje de muestras tumorales mutadas fue *TP53* con un 88%, seguido de *FOXO1* con un 48% y el *AR* ocupa el tercer lugar con un 28% de las muestras tumorales mutadas. Los genes *SRD5A2* y *Nkx3.1* no presentaron ningún tipo de mutación en las muestras tumorales.

El tipo de mutación más frecuente en las muestras tumorales fue el de tipo *missense*, el segundo fue el de *frameshift deletion* (Figura 5). No se encontró relación entre el valor de la escala de Gleason y el número de mutaciones encontradas en cada muestra.

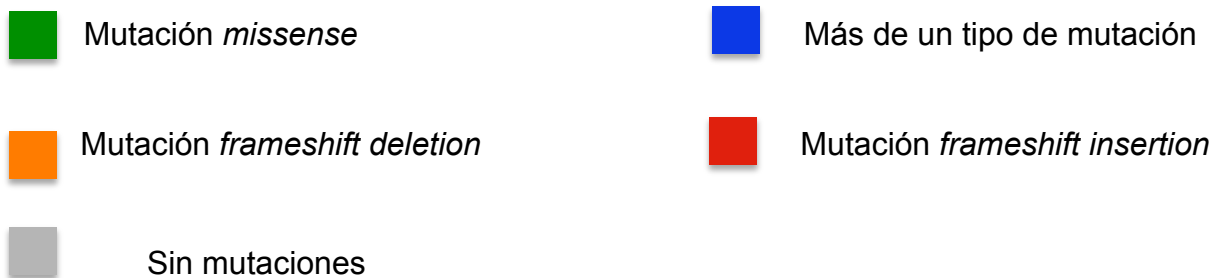
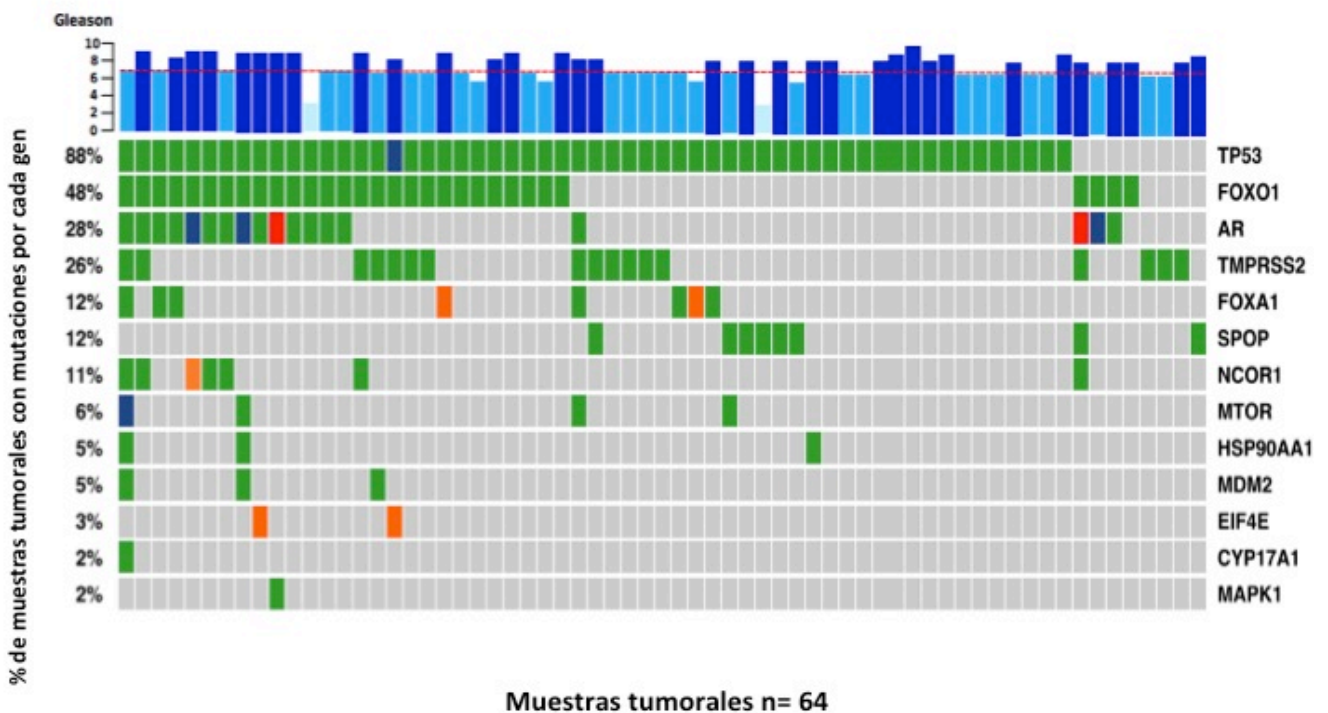





Figura 5. Tipos de variantes encontradas y su frecuencia en muestras tumorales.

Representación gráfica de los tipos de variantes encontradas en las muestras tumorales por cada gen secuenciado. Cada columna representa a una muestra. Los genes secuenciados fueron organizados en orden descendente de acuerdo al porcentaje de muestras tumorales que presentaron algún tipo de variante. Cada casilla en la figura representa una de las muestras tumorales secuenciadas. No se encontró relación entre el grado Gleason que presentó cada paciente con el número de mutaciones encontradas. La figura se elaboró utilizando el programa *Rstudio* (Anexo 3).

Mutaciones encontradas en cada gen para ambos grupos

Las mutaciones encontradas para ambos grupos de estudio se compararon en cada gen. Se cuantificó la frecuencia de cada mutación encontrada. Se separaron las mutaciones encontradas en las muestras “Tumorales” de las mutaciones encontradas en las muestras “No Numorales”. Se anotaron las mutaciones correspondientes en un esquema representando los dominios funcionales de cada proteína. Las figuras 6-19 representan los productos proteicos de los genes secuenciados. Para cada gen analizado se muestran las mutaciones funcionales y su nomenclatura a nivel proteico. En la parte superior de los esquemas se muestran las mutaciones encontradas en muestras “no tumorales”. En la parte inferior de los esquemas se muestran las mutaciones encontradas en muestras “no tumorales”. Las mutaciones anotadas en los esquemas tienen la siguiente nomenclatura de colores:

- ✓  Mutaciones presentes en ambos grupos
- ✓  Mutaciones presentes en muestras “tumorales”
- ✓  Mutaciones presentes en muestras “no tumorales”

A continuación, se muestran esquemas de los productos proteicos de los genes secuenciados (Figuras 6-19), en ellos se pueden observar las frecuencias de las mutaciones encontradas para cada grupo de estudio. Las frecuencias se cuantificaron como el número de muestras de dicho grupo que presentó la mutación. El número total de muestras “No TumORAles” es 32, mientras que el número total de muestras “TumORAles” es de 64.

Mediante los esquemas ya mencionados, se logró evidenciar a los genes que presentaron mayor número de mutaciones exclusivas del grupo de muestras “TumORAles”, como lo fueron: *AR* (Figura 6), *SPOP* (Figura 9), *MDM2* (Figura 14), *FOXA1* (Figura 10) y *MTOR* (Figura 12).

Mutaciones encontradas en *AR*

El *AR* es el gen con el tercer mayor porcentaje de variaciones observadas en las muestras TumORAles, con el 28% de muestras mutadas (Figura 6). Sin embargo, es el gen con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras TumORAles. La mutación con más alta incidencia en éste gen es p.Gln58Leu, presente en 6 de 64 muestras, es decir 9.4% de las muestras TumORAles. Dicha mutación se observó presente también en 3 de 32 de las muestras No TumORAles (9.4% de dicho grupo). Adicionalmente, se encontró una inserción que resultó en un cambio en el marco de lectura, p.Gln74fs presente en 4 de 64 muestras TumORAles, es decir 6.3% de dichas muestras. Adicionalmente, se encontraron en las muestras TumORAles: 16 mutaciones puntuales, 1 mutación de cambio en el marco de lectura por inserción, 2 mutaciones de cambio en el marco de lectura por deleción y 1 mutación sin sentido (*nonsense*). El dominio N-terminal (NTD) presentó el mayor número de mutaciones en muestras TumORAles. El 84% de las mutaciones encontradas corresponden a dicho dominio funcional. El NTD es la región proteica que interacciona con los diferentes coreguladores del *AR*. Esta región ha sido reportada como la más variable de la proteína⁸⁹. El resto de las mutaciones presentes en muestras TumORAles se encontraron en el LBD. Una muestra No Tumoral presentó la única mutación en el DBD. Región encargada de la interacción entre la proteína y el DNA, en los AREs.

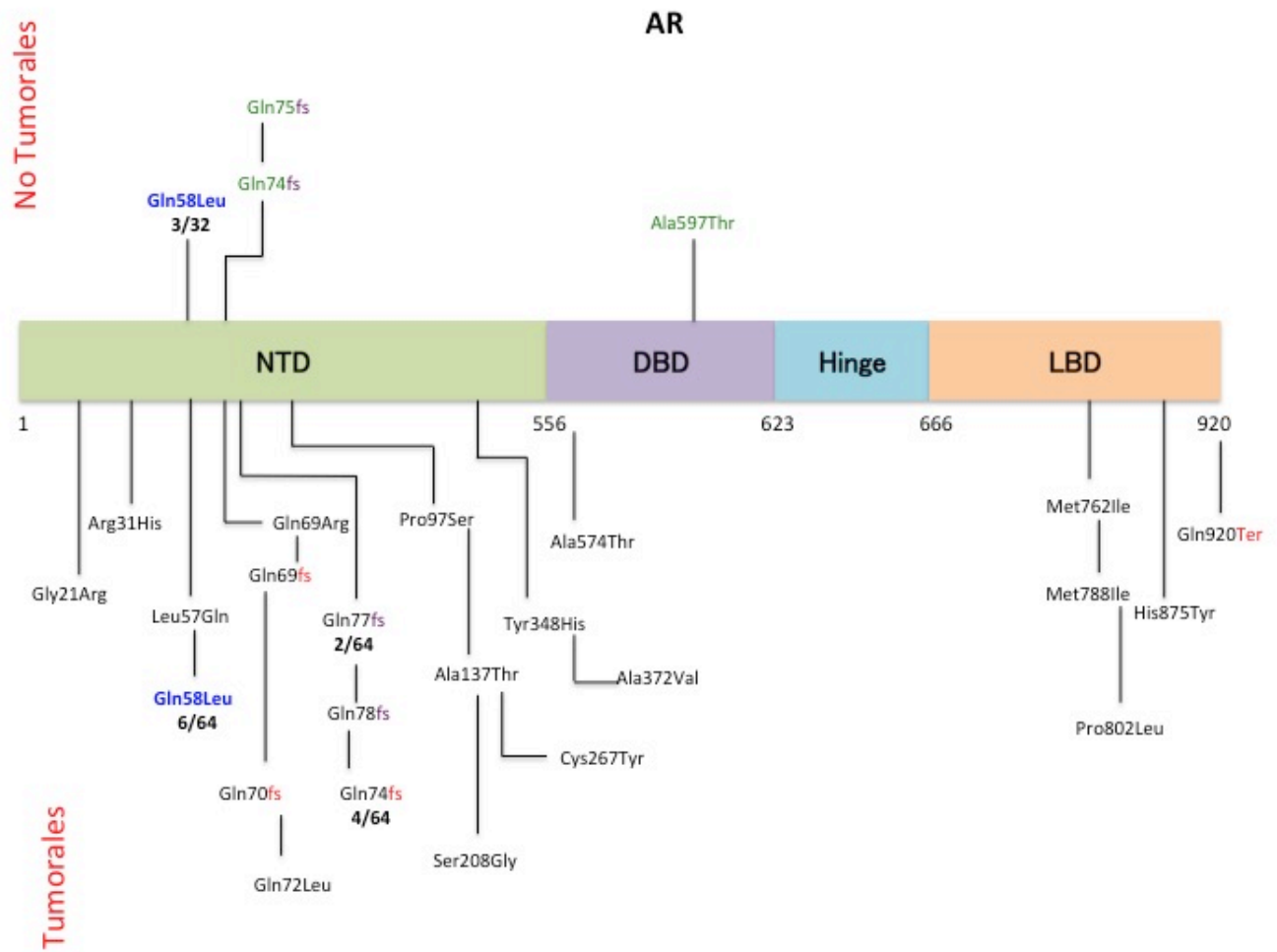


Figura 6. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en el gen *AR*.

Mutaciones encontradas en TP53

El gen *TP53* presentó el porcentaje más elevado de muestras Tumorales mutadas (Figura 7). Una gran parte de las muestras presentó la mutación Pro72Arg, variante presente en la región rica en prolinas (PRR por sus siglas en inglés *Proline rich region*), un dominio estructural que funciona como enlace entre el dominio TAD 1/2 (por sus siglas en inglés *Topologically associating domain*) y el DBD por sus siglas en inglés *DNA binding domain*). Dicha variante se observó presente en 54 de 64 muestras Tumorales. La mutación se encontró presente en 30 de 32 muestras No Tumorales. En el DBD se encontró la mutación His193Pro, presente en dos muestras tumorales y en ninguna muestra No Tumoral. La mutación *nonsense* Arg306Ter se encontró en una muestra Tumoral. Adicionalmente, se encontraron dos mutaciones en muestras No Tumorales, Arg306Gln y Lys372Glu. Ésta última corresponde a la región Carboxilo terminal (C-terminal), región que regula y promueve cambios estructurales en el DBD.

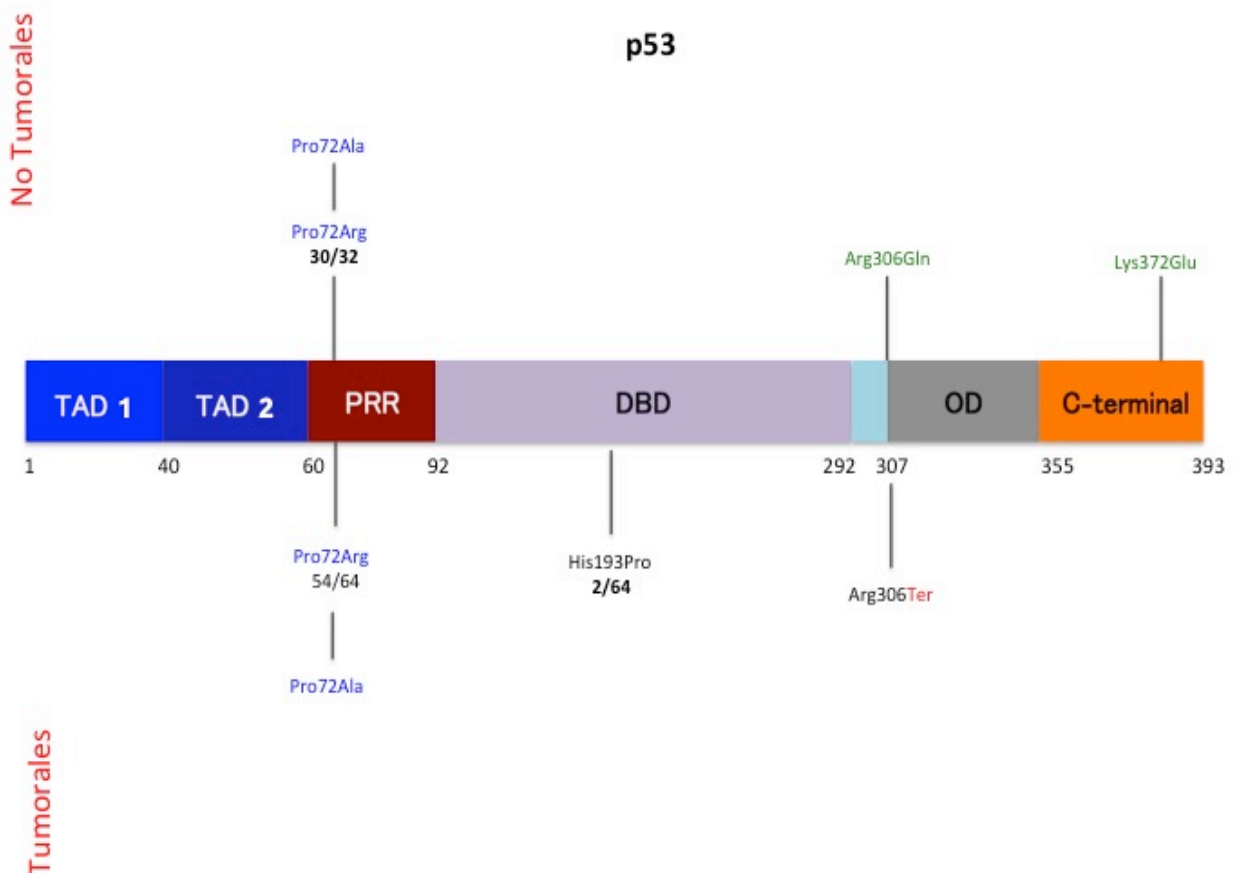


Figura 7. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en el gen *TP53*.

Mutaciones encontradas en FOXO1

El gen FOXO1 fue el segundo con el porcentaje más alto de mutación en muestras Tumorales, con un 48% de las mismas (Figura 8). La variante p.Tyr421Cys está ubicada en una región estructural, localizada entre el dominio de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés, *nuclear localization signal*) y el dominio de transactivación (TAD por sus siglas en inglés, *trans activation domain*). Dicha mutación se encontró presente en 21 de 32 muestras No Tumorales, lo que representa el 65.6% de las muestras de dicho grupo.

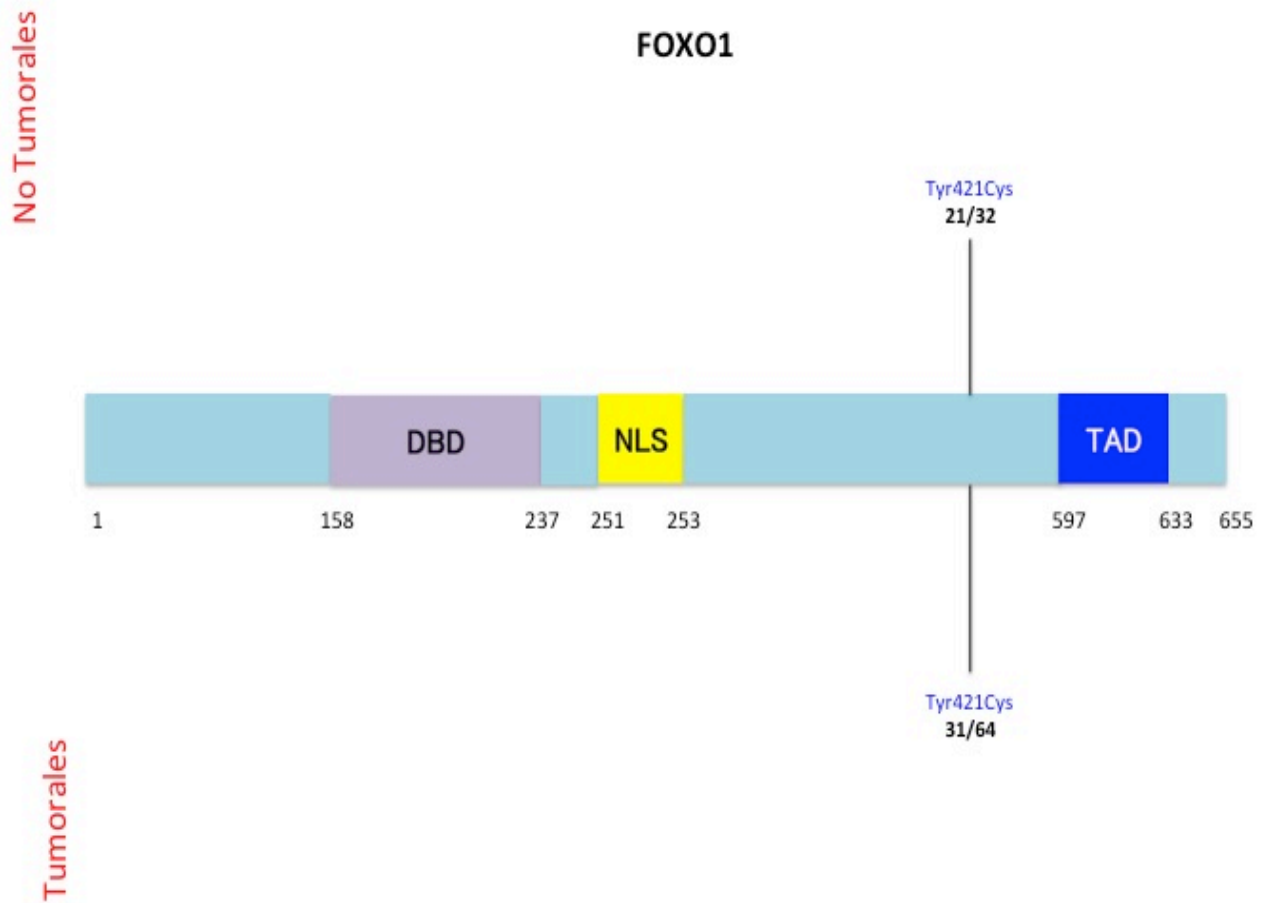


Figura 8. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en FOXO1.

Mutaciones encontradas en *SPOP*

SPOP junto con *FOXA1* el quinto gen con el mayor número de muestras Tumorales que presentan mutaciones (Figura 9). Todas las variantes encontradas para el gen corresponden a muestras Tumorales. La variante mas común, p.Phe133Ser se encontró en 3 de 64 muestras, es decir en 4.7% de las muestras Tumorales. En el mismo aminoácido encontramos otros dos tipos de variantes: p.Phe133Cys y p.Phe133Val, sumando un total de 5 mutaciones encontradas para el aminoácido número 133, que forma parte de la región que funciona como secuencia de localización nuclear (NLS), ésta activa el transporte de la proteína hacía el interior del núcleo celular. Las otras dos mutaciones halladas fueron: Phe102Val y Phe102Cys están contenidas en el dominio MATH (por sus siglas en inglés, *meprin and traf homology*), cuya función es la asociación estructural de la proteína consigo misma.

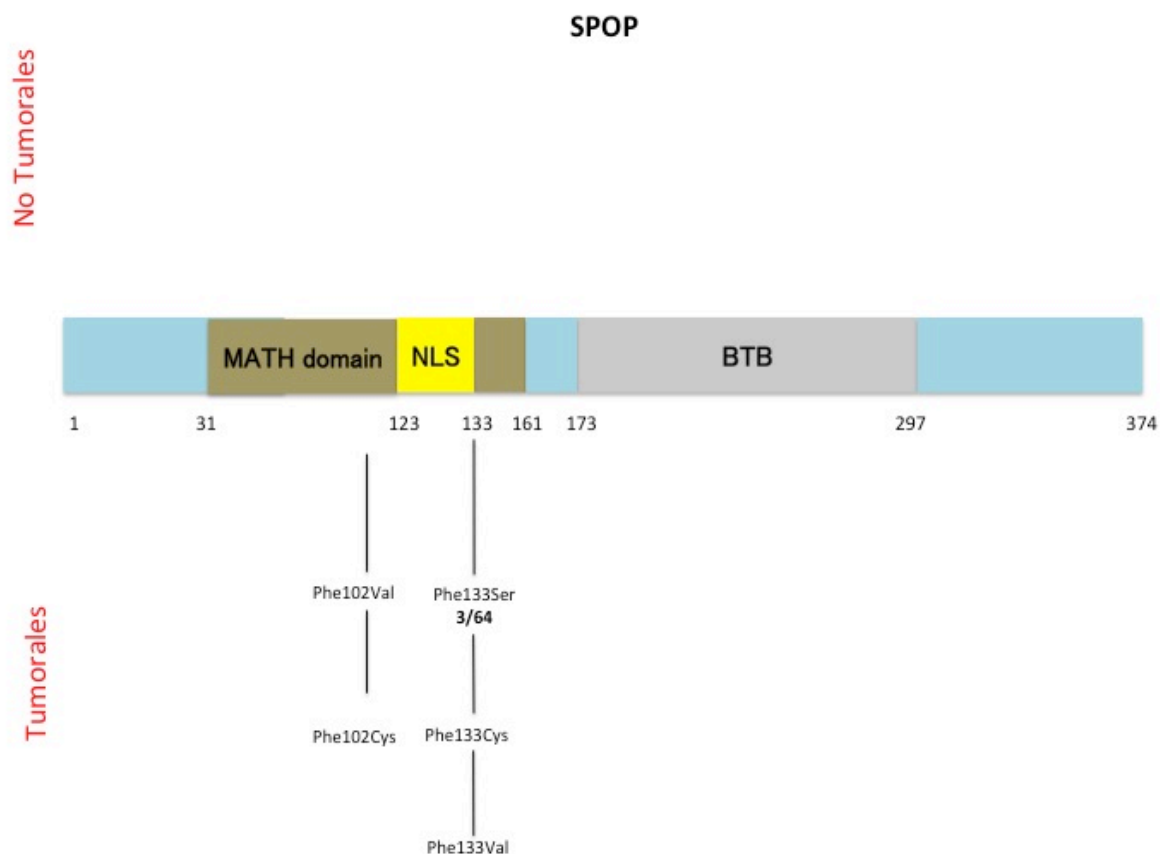


Figura 9. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *SPOP*.

Mutaciones encontradas en *FOXA1*

FOXA1 es, junto con *SPOP*, el quinto gen con el mayor porcentaje de muestras Tumorales que presentan mutaciones (Figura 10). Dentro del gen, la mutación más común es p.Ser423Asn, observada en 3 de 64 muestras Tumorales, es decir en el 4.7% de las mismas. La misma se encontró en una de las 32 muestras No Tumorales, es decir en 3.1% de dicho grupo. Dicha mutación junto con p.Ala423Thr, se encontraron en la región carboxilo-terminal (HNF₃ C-terminal), región necesaria para la trans-activación de la proteína mediante su unión con las histonas H₃ y H₄. El resto de las mutaciones encontradas en muestras Tumorales están presentes en la región FH (por sus siglas en inglés: *Forkhead*), dominio de unión a DNA. Las muestras No Tumorales presentaron las mutaciones; p.Arg219Cys en el dominio FH, y la ya mencionada, p.Ser448Asn en la región HNF₃ C-terminal.

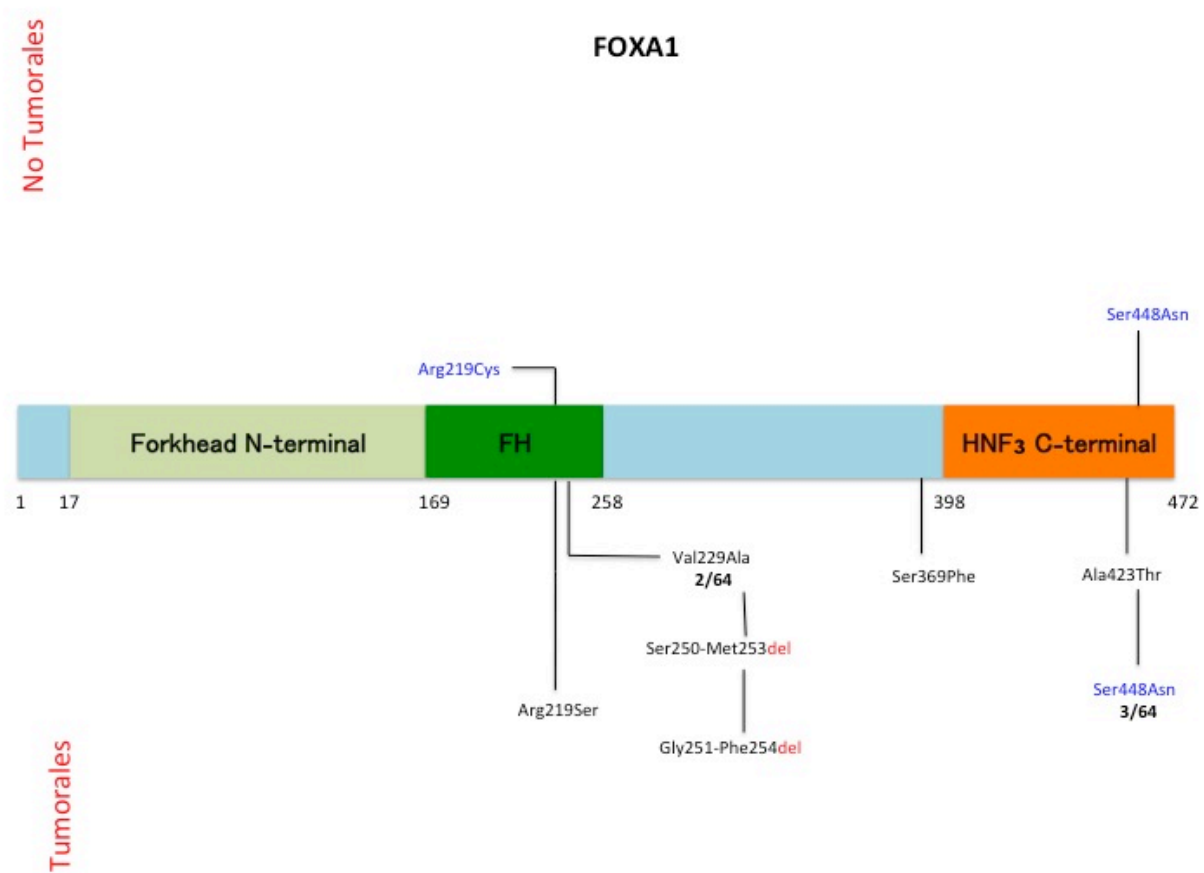


Figura 10. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *FOXA1*.

Mutaciones encontradas en *TMPRSS2*

TMPRSS2 es el cuarto gen con el mayor porcentaje de mutaciones en muestras tumorales (Figura 11). La mutación más destacada en las muestras Tumorales es Val160Met, hallada presente en 13 de 64 muestras, es decir 20.3% de las mismas. Esta mutación también se encontró presente en 9 de 32 muestras No Tumorales, es decir 28% de dicho grupo. Adicionalmente, se encontró la variante His169Tyr en una de las muestras Tumorales. Ambas variantes se encontraron dentro de la región SRCR (por sus siglas en inglés, *Scavenger receptor cystein-rich*), región proteica cuya función no ha sido esclarecida. Se ha propuesto que su función pudiera ser regular interacciones proteína-proteína y de unión a ligando. El resto de las mutaciones presentes en las muestras No Tumorales se observaron en regiones estructurales.

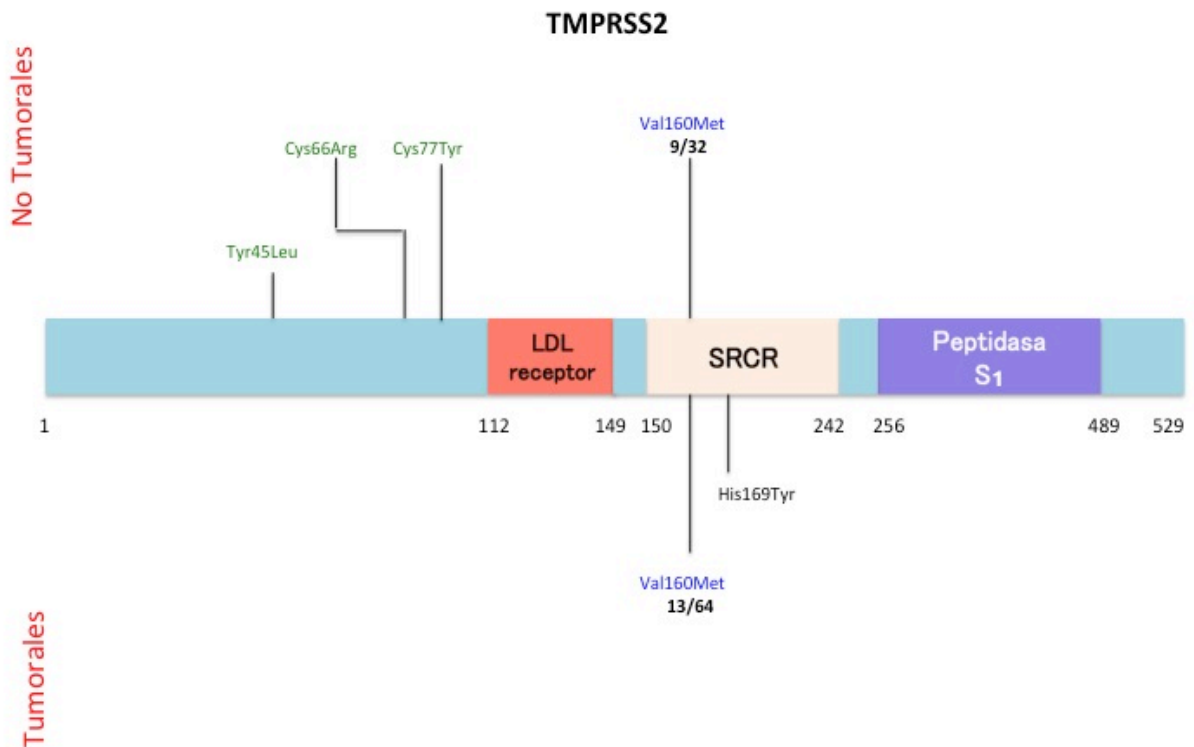


Figura 11. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *TMPRSS2*.

Mutaciones encontradas en *MTOR*

MTOR fue uno de los genes con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras Tumorales (Figura 12). El dominio HEAT (por sus siglas en inglés, *Huntington Elongation Factor 3, PR65/A, TOR*), fue el que presentó la mayor variabilidad, tanto en muestras Tumorales como en No Tumorales. El dominio está conformado por repetidos en tándem de dos hélices alfa antiparalelas montadas alrededor de un eje común. Tiene una función estructural de interacción que influye en la función global de la proteína. El segundo dominio mayormente mutado en muestras Tumorales es FAT (por sus siglas en inglés, *focal adhesión targeting region*), cuya función es la unión con los microfilamentos de actina para su transporte dentro de la célula. El resto de las mutaciones Tumorales se encontró en regiones estructurales.

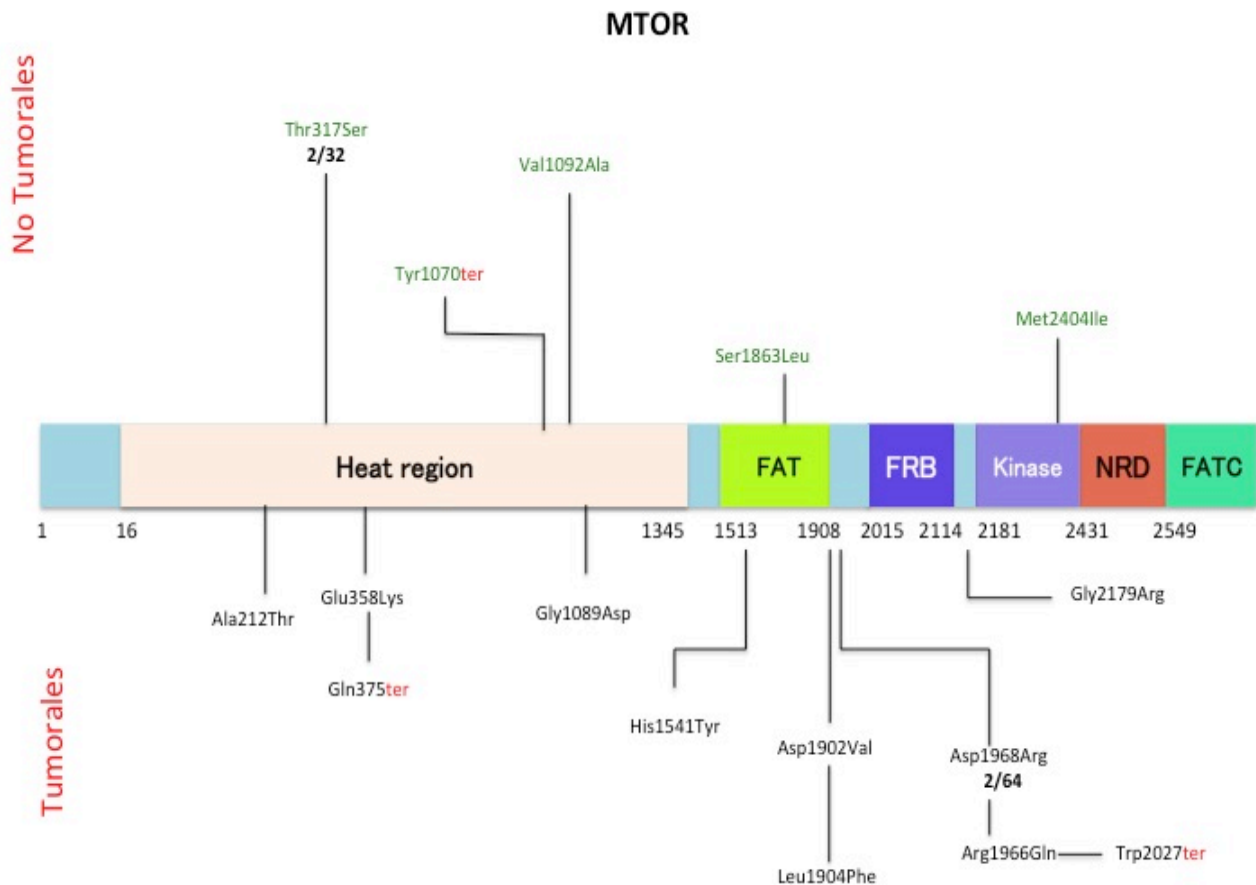


Figura 12. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *MTOR*.

Mutaciones encontradas en *NCOR1*

NCOR1 presentó variantes en el 11% de las muestras Tumorales y en el 43% de las No tumorales (Figura 13). La mutación más prevalente en ambos grupos fue p.Gly150Arg, la cual está fuera de algún dominio funcional particular. El resto de las mutaciones tumorales se encontraron en regiones que no están caracterizadas como dominios proteicos funcionales.

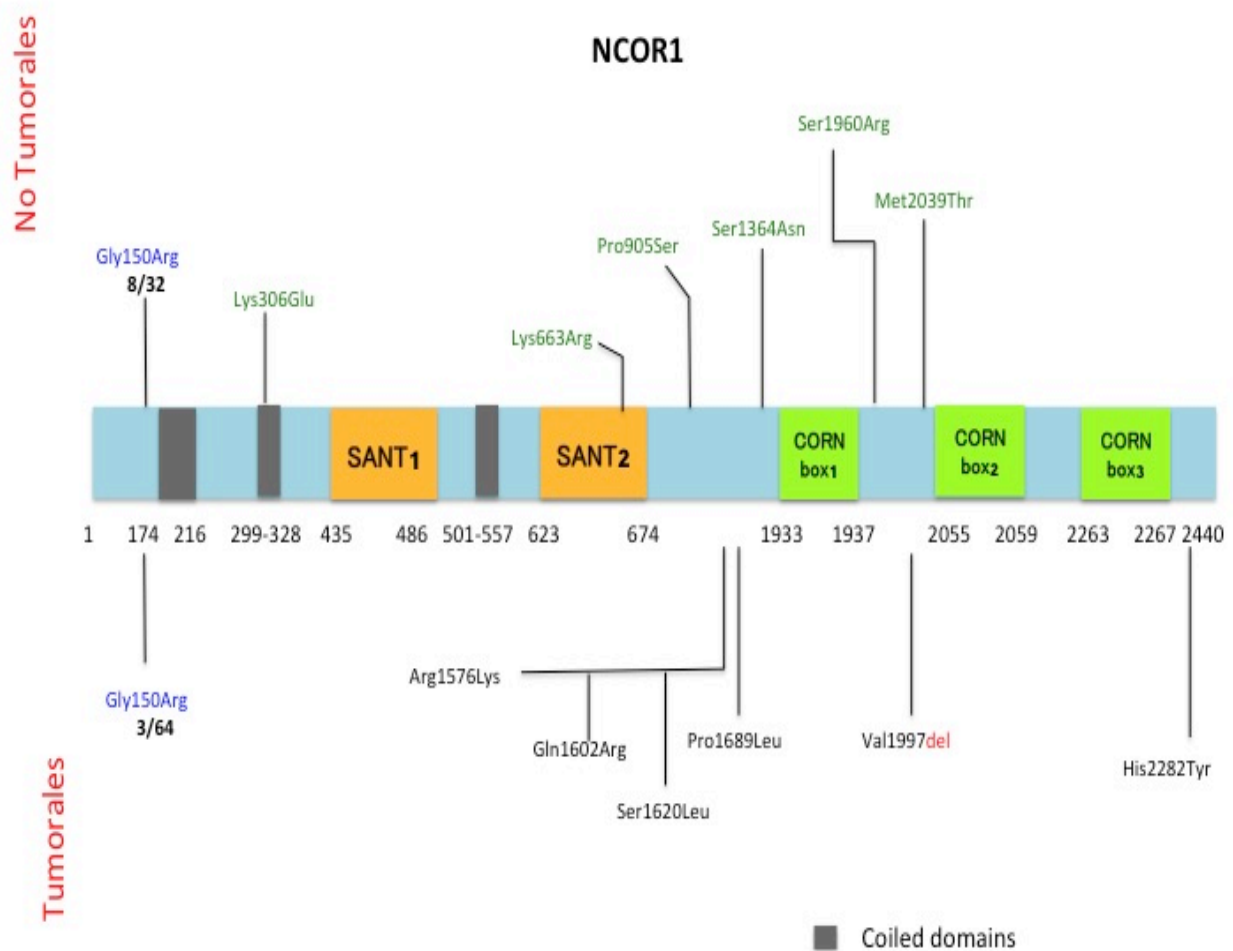


Figura 13. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *NCOR1*.

Mutaciones encontradas en MDM2

Al igual que *SPOP*, el gen *MDM2* presentó todas sus mutaciones exclusivamente en muestras Tumorales (Figura 14). La mayoría se encontraron en una región estructural entre la región de señal de exportación nuclear (NES por sus siglas en inglés, *nuclear exporting signal*) y la secuencia de localización celular NLS (por sus siglas en inglés, *nuclear localziation signal*). La mutación p.Ser196Phe se encontró dentro de la región NES.

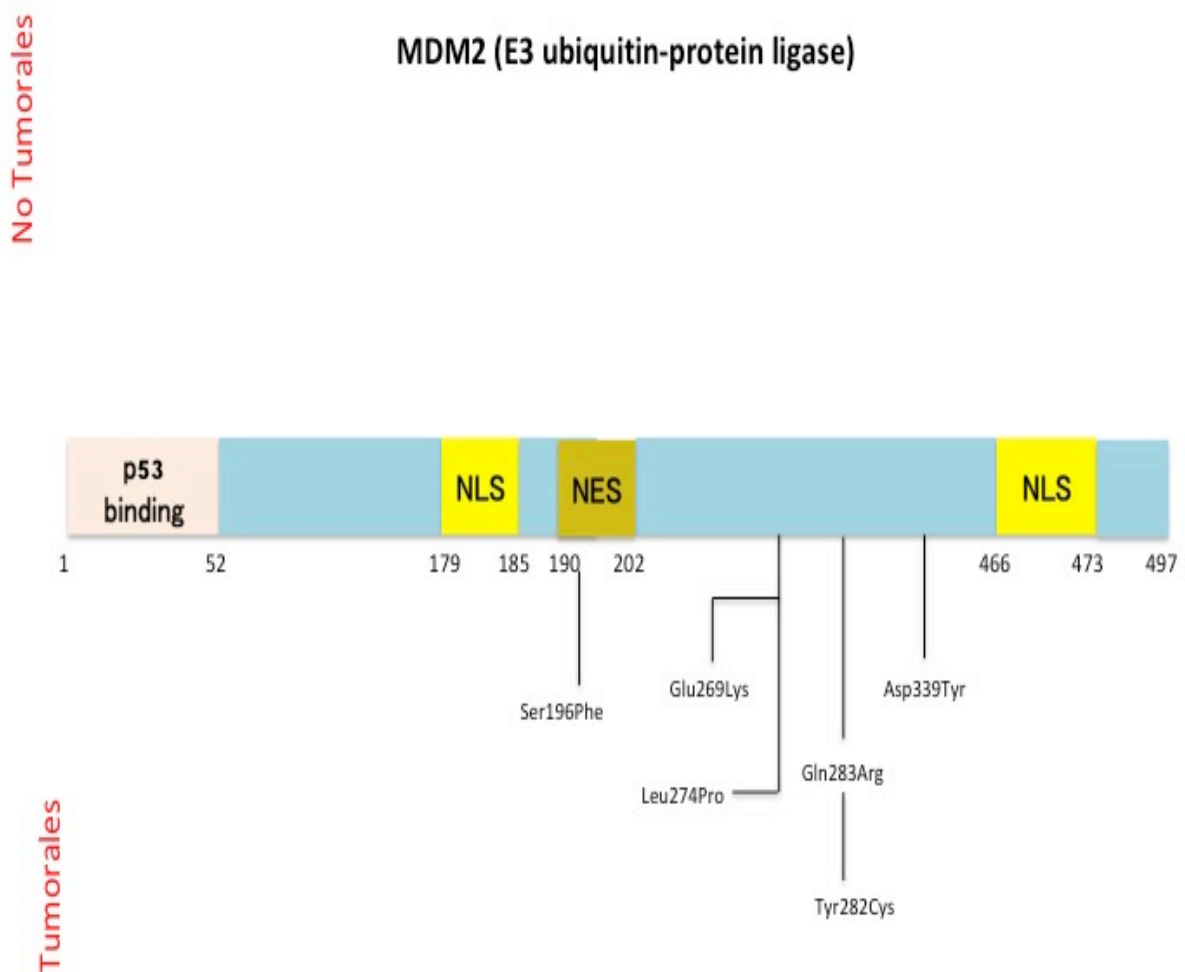


Figura 14. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *MDM2*.

Mutaciones encontradas en HSP90AA1

Se encontraron cuatro mutaciones de cambio de sentido (*missense*). En muestras Tumorales, las mutaciones se encontraron en regiones estructurales de la proteína (Figura 15).

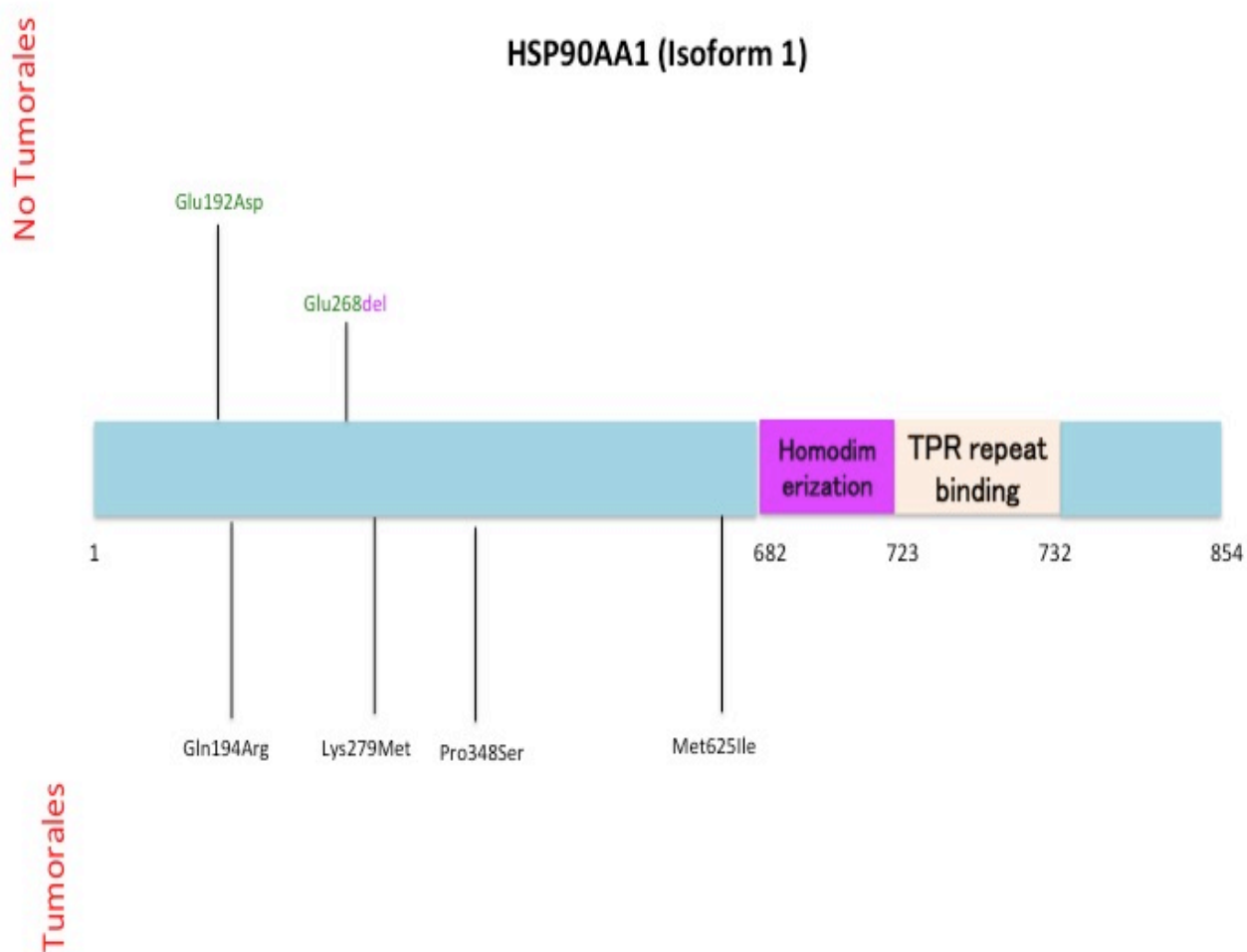


Figura 15. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *HSP90AA1*

Mutaciones encontradas en *SRD5A2*

En el gen *SRD5A2* no se encontraron mutaciones en muestras Tumorales (Figura 16). La mutación descrita p.Leu20Phe se reportó en dos muestras No Tumorales en el primer dominio transmembranal de la proteína.

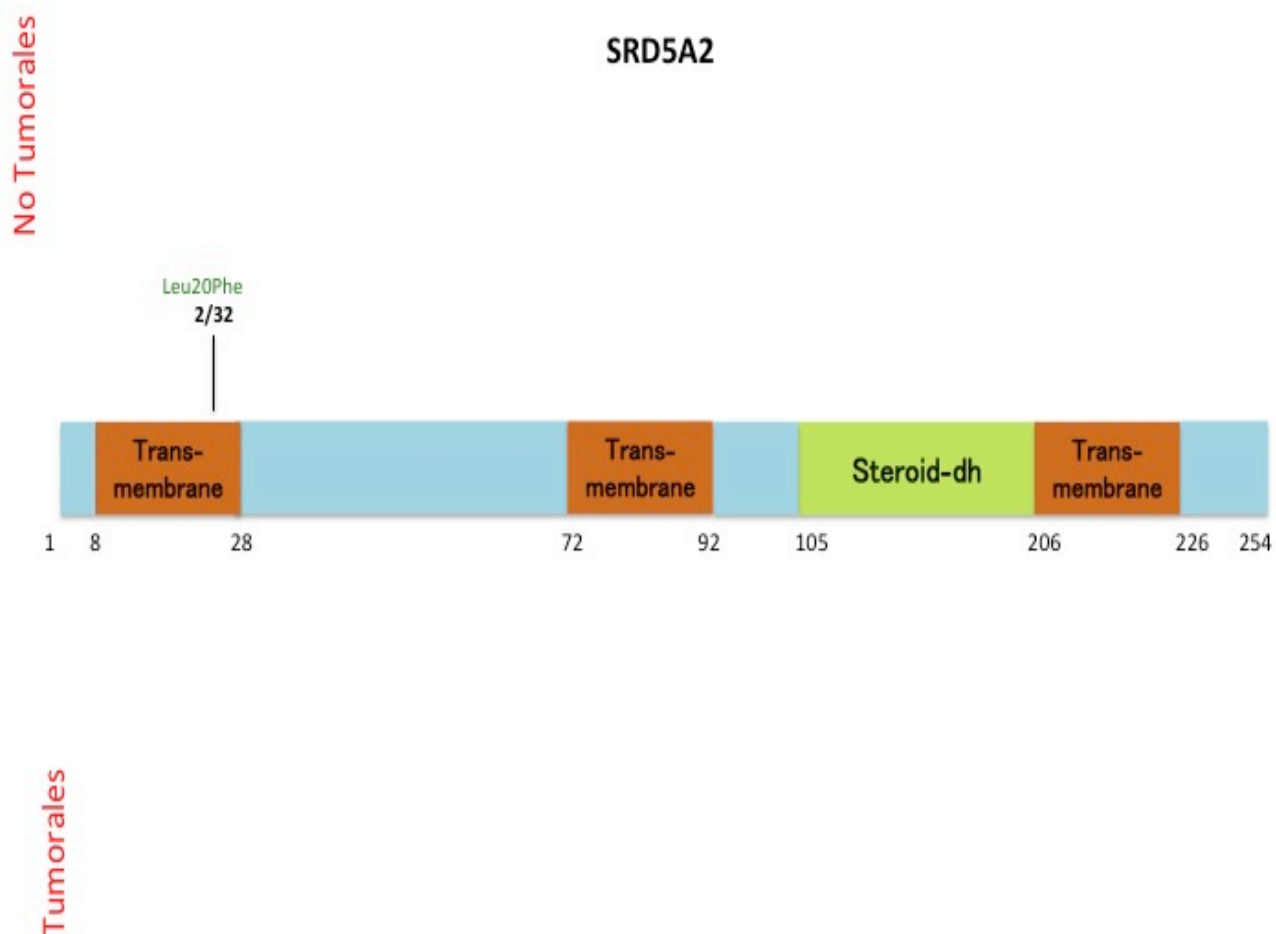


Figura 16. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *SRD5A2*

Mutaciones encontradas en MAPK1

Para éste gen se encontró una mutación proveniente de una muestra Tumoral, p.Glu314Gly, que se localiza fuera del dominio funcional Proteína cinasa (*Protein kinase domain*, en inglés) (Figura 17).

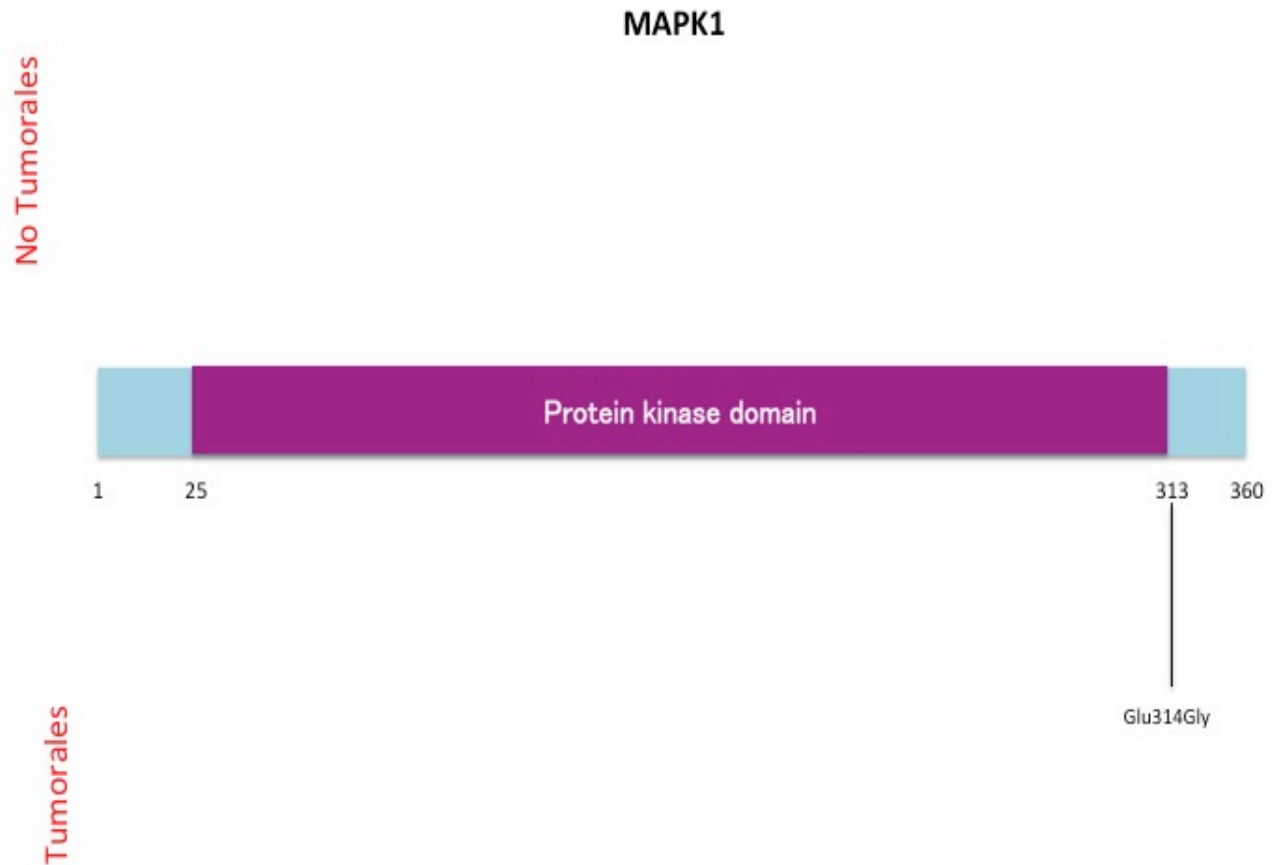


Figura 17. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en MAPK1

Mutaciones encontradas en *eIF4E*

En este gen observamos (Figura 19) dos muestras Tumorales con una mutación de corrimiento en el marco de lectura en el aminoácido 48. La mutación se presentó en una zona estructural entre la región de unión a 4EBP y un dominio de unión al *cap*.

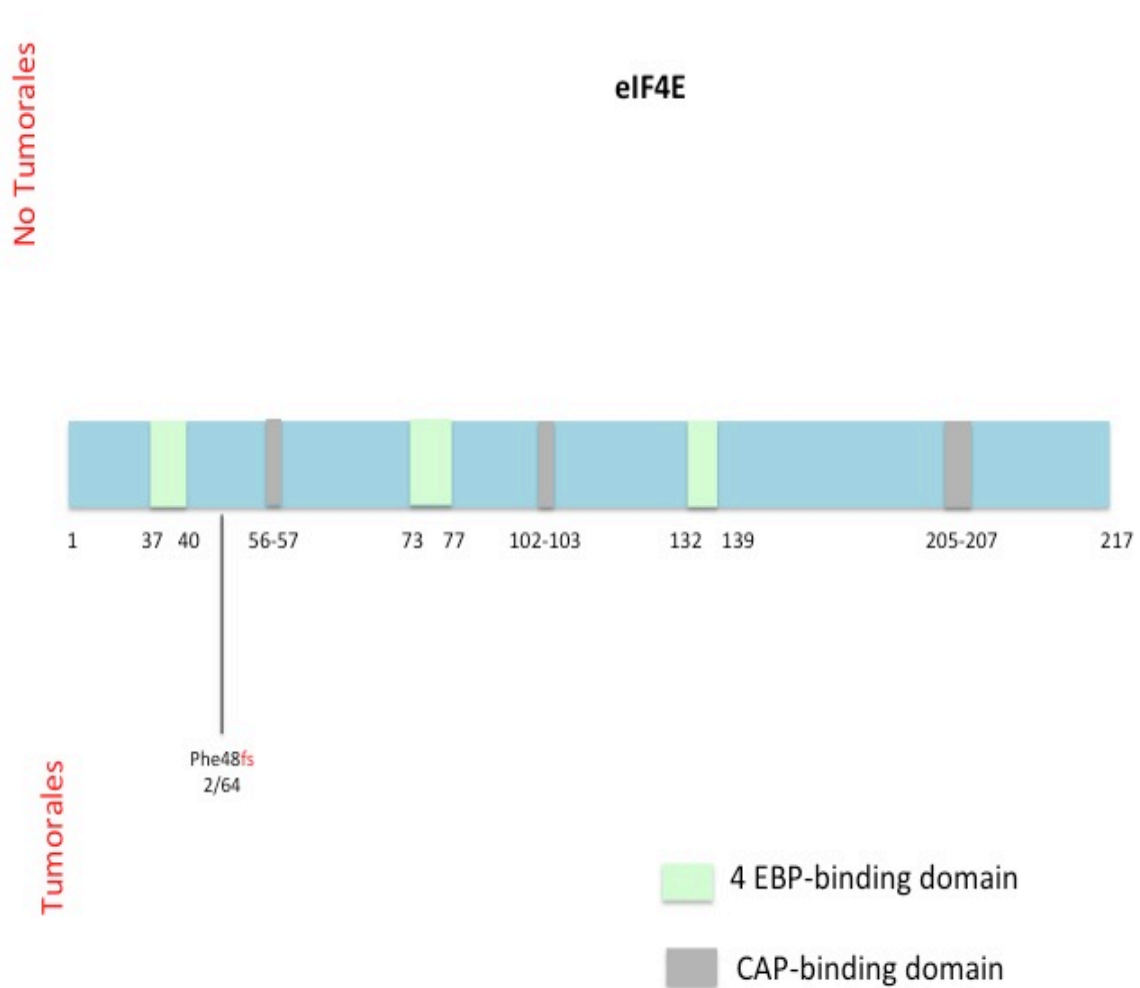


Figura 19. Representación gráfica de las variantes funcionales encontradas en *eIF4E*.

Genes con mutaciones exclusivas en muestras tumorales

Debido a la alta incidencia observada de algunas mutaciones en muestras no tumorales, se separaron las mutaciones encontradas exclusivamente en muestras tumorales de las muestras no tumorales y se cuantificaron para cada gen (Figura 20). Realizando este ajuste, se observó que el gen con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales es *AR*, seguido de *MTOR* y *SPOP*. La siguiente figura muestra las frecuencias ajustadas.

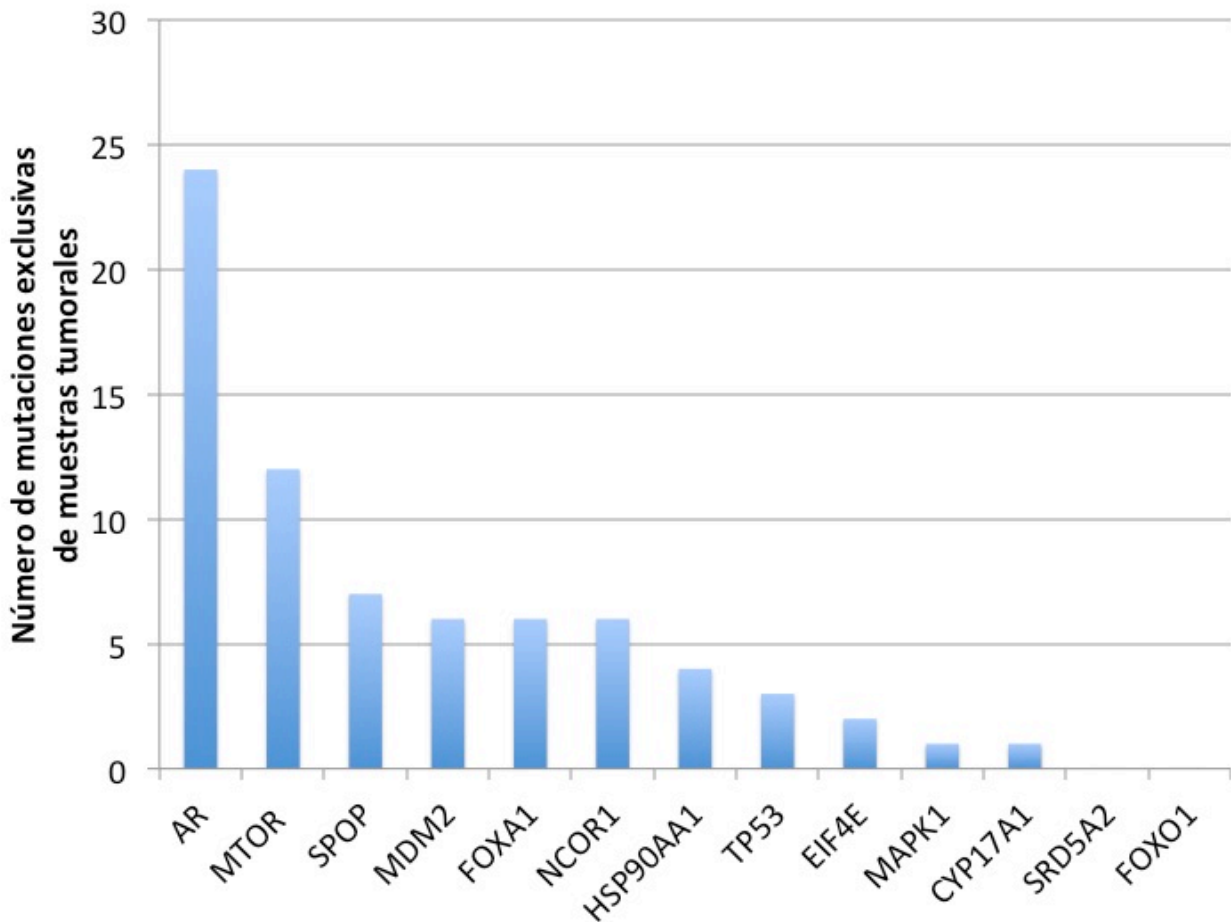


Figura 20. Número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales. Al separar las mutaciones se encuentran exclusivamente presentes en muestras tumorales, se encontró que *AR*, siendo el tercer gen mayormente mutado en muestras tumorales antes del ajuste, es el gen con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales. Destaca también el caso de *MTOR*, que es el segundo gen con el mayor número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales después del ajuste. Caso contrario al de *TP53*, que es el de mayor porcentaje de muestras mutadas antes del ajuste (Figura 5) es el octavo gen en frecuencia de mutaciones después del ajuste.

Mutaciones con una correlación positiva con variables clínicas

Tabla 3. Mutaciones con una correlación estadística positiva con niveles elevados de APE en sangre.

Gen	Mutación	Cambio de aminoácido	Prueba estadística ^a	Significancia estadística	Nivel de APE Asociado (ng/mL)
FOXO1	1262A>G	Tyr421Cys	U de Mann-Whitney	0.035	Silvestre (TT): 14.50
					Mutación (TC): 31.80
SPOP	398T>C	Phe133Ser	U de Mann-Whitney	0.001	Silvestre (AA): 16.40
					Mutación (AG): 1496.00
TMPRSS2	478G>A	Val160Met	Kruskal-Walis	0.03	Silvestre (CC): 14.25
					Mutación (CT): 32.10
					Mutación (TT): 23.90
TP53	215C>G	Pro72Arg	Kruskal-Walis	0.006	Silvestre (CC): 12.00
					Mutación (GC): 25.35
					Mutación (GG): 30.95

^aLa significancia estadística se analizó por medio de las pruebas no paramétricas para muestras independientes indicadas en la tabla. Se entienden como muestras independientes a los grupos en que se clasificaron las muestras dependiendo de su genotipo (silvestre o mutación). Para todas las muestras se probó estadísticamente la hipótesis nula: “la distribución de APE es la misma entre las categorías”. En todas las mutaciones indicadas se rechazó esta hipótesis nula, por lo que se interpreta como que sí existe una correlación positiva con el nivel de APE.

La prueba de U de Mann-Whitney se utilizó en los casos que presentaron dos muestras independientes (silvestre y mutación). La prueba Kruskal-Wallis se utilizó en los casos que presentaron tres muestras independientes (silvestre y dos mutaciones).

Predicciones de impacto funcional

Utilizamos la plataforma en línea de Polyphen-2 [genetics.bwh.harvard.edu/pph2/] para predecir el impacto funcional de las mutaciones presentes en muestras Tumorales. De acuerdo con la puntuación obtenida por cada mutación (*Polyphen score*), la plataforma asigna valores distintos que se pueden categorizar en diferentes grupos:

- **0.0 – 0.15:** Las mutaciones que se encuentran en este rango tienen una predicción “benigna”, es decir, que la presencia de la mutación no afecta la funcionalidad de la proteína.
- **0.15 – 0.85:** Las mutaciones que se encuentran en este rango se clasifican como “probablemente deletéreas”, es decir, que su presencia pudiera comprometer la funcionalidad de la proteína.
- **0.85 – 1.0:** Las mutaciones que se encuentran en este rango se clasifican como “deletéreas”, es decir, que con una mayor seguridad la presencia de dichas mutaciones puede afectar el funcionamiento de la proteína.
- **NA:** La mutación encontrada no pudo ser evaluada por la plataforma (“indeterminable”), por lo que su posible impacto en la funcionalidad de la proteína es desconocido.

Utilizando las categorías mencionadas, se obtuvieron los resultados presentados a continuación (Tabla 4). Los genes con el mayor número de mutaciones con pronóstico deletéreo fueron *SPOP* y *MTOR*, cada uno presentó cuatro mutaciones deletereas.

Tabla 4. Predicción del impacto funcional de las mutaciones presentes en muestras tumorales utilizando Polyphen-2 como herramienta *in silico*.

Gen	Mutación	Polyphen-score	Predicción
AR	p.Gln69fs	NA	Indeterminable
AR	p.Gln70fs	NA	Indeterminable
AR	p.Gln74fs	NA	Indeterminable
AR	p.Gln77fs	NA	Indeterminable
AR	p.Thr661fs	NA	Indeterminable
AR	p.Ala372Val	NA	Indeterminable
AR	p.Arg31His	NA	Indeterminable
AR	p.Gln58Leu	0.393	Probablemente deletérea
AR	p.Gln69Arg	0.086	Benigna
AR	p.Gln72Leu	0.186	Probablemente deletérea
AR	p.Gly21Arg	1	Deletérea
AR	p.Leu57Gln	0.002	Benigna
AR	p.Pro97Ser	0.007	Benigna
AR	p.Gln920Ter	NA	Indeterminable
<i>eIF4E</i>	p.Phe48fs	NA	Indeterminable
<i>FOXA1</i>	p.Ala423Thr	0.99	Benigna
<i>FOXA1</i>	p.Arg219Ser	1	Deletérea
<i>FOXA1</i>	p.Ser448Asn	0.001	Benigna
<i>FOXA1</i>	p.Gly251_Phe254del	NA	Indeterminable
<i>FOXA1</i>	p.Ser250_Met253del	NA	Indeterminable
<i>HSP90AA1</i>	p.Lys279Met	NA	Indeterminable
<i>HSP90AA1</i>	p.Gln194Arg	NA	Indeterminable
<i>MAPK1</i>	p.Glu314Gly	0.731	Probablemente deletérea
<i>MDM2</i>	p.Gln283Arg	0	Benigna
<i>MDM2</i>	p.Tyr282Cys	0.087	Benigna
<i>MTOR</i>	p.Asp1902Val	1	Deletérea
<i>MTOR</i>	p.His1968Arg	1	Deletérea
<i>MTOR</i>	p.Leu1904Phe	1	Deletérea
<i>MTOR</i>	p.His1541Tyr	0.95	Deletérea
<i>NCOR1</i>	p.Pro1689Leu	NA	Indeterminable
<i>NCOR1</i>	p.Val1997del	NA	Indeterminable
<i>NCOR1</i>	p.Gly150Arg	0.994	Deletérea

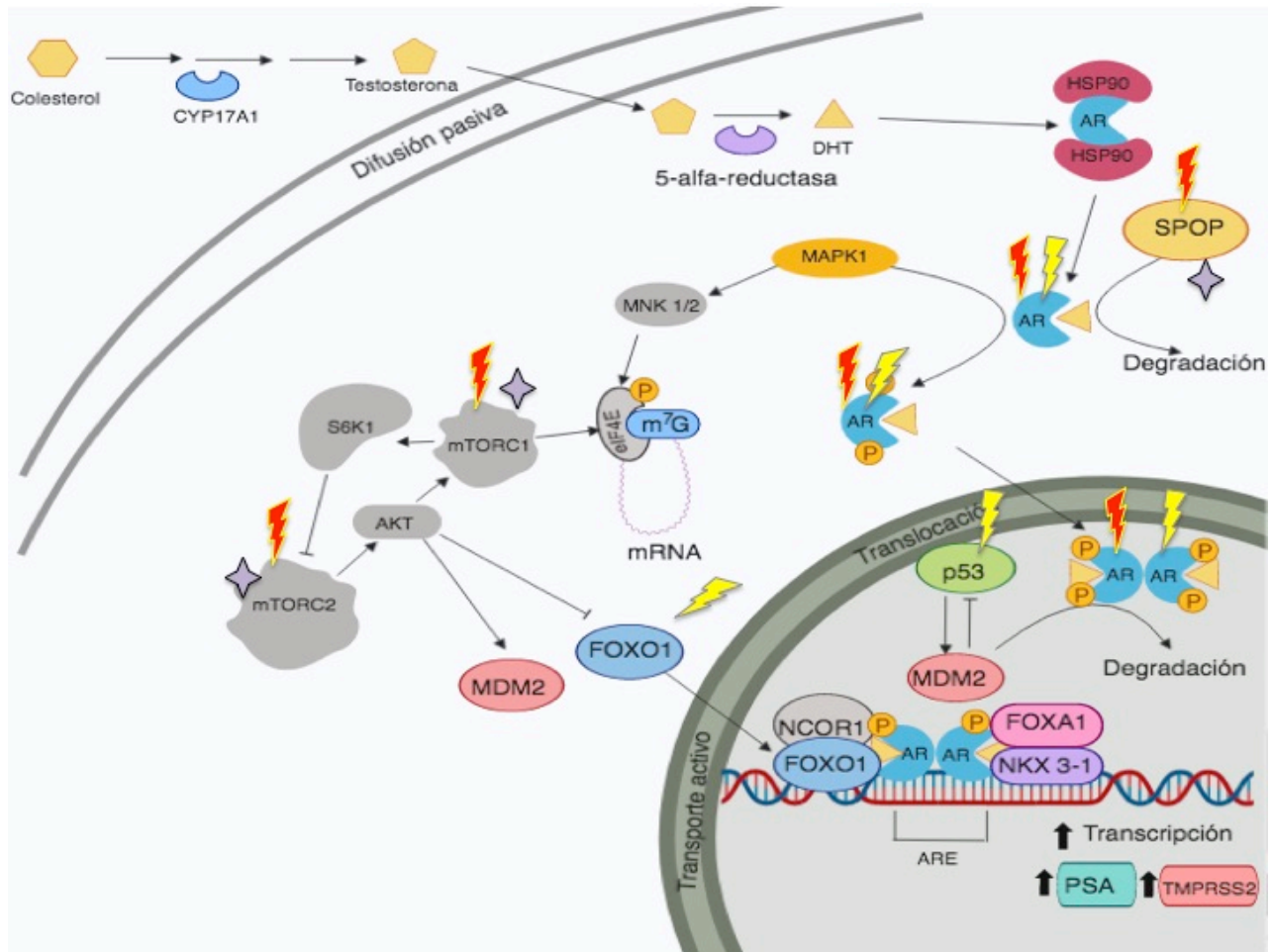
<i>NCOR1</i>	p.Gln1602Arg	0.987	Deletérea
<i>SPOP</i>	p.Phe102Cys	1	Deletérea
<i>SPOP</i>	p.Phe102Val	0.99	Deletérea
<i>SPOP</i>	p.Phe133Cys	1	Deletérea
<i>SPOP</i>	p.Phe133Ser	1	Deletérea
<i>SPOP</i>	p.Phe133Val	0.487	Probablemente deletérea
<i>SPOP</i>	p.Leu157Phe	NA	Indeterminable
<i>TMPRSS2</i>	p.Val160Met	0.997	Deletérea
<i>TP53</i>	p.Pro72Arg	0.083	Benigna
<i>TP53</i>	p.His193Pro	1	Deletérea
<i>TP53</i>	p.Pro72Ala	0	Benigna
<i>TP53</i>	p.Arg306Ter	NA	Indeterminable
<i>TP53</i>	p.Arg175His	0.632	Probablemente deletérea
<i>TP53</i>	p.Phe270Ile	1	Deletérea
<i>SRD5A2</i>	p.Leu20Phe	0.006	Benigna

Genes con mutaciones relevantes en la vía de señalización del AR

Considerando los análisis realizados, en el siguiente esquema (Figura 21) se señalan los genes que han destacado en cada uno de los análisis realizados. Mediante dicho esquema se busca visualizar cómo es que los productos proteicos de los genes con las mutaciones más relevantes, pudieran afectar a la vía de señalización del AR de manera global. Los genes resaltados en el esquema son los siguientes: los tres genes con un mayor porcentaje de muestras tumorales mutadas (*TP53*, *AR* y *FOXO1*); los tres genes con el mayor número de mutaciones exclusivas en muestras tumorales (*AR*, *MTOR* y *SPOP*); los dos genes con el mayor número de mutaciones con pronóstico deletéreo de acuerdo con la plataforma Polyphen-2 (*SPOP* y *MTOR*).

De manera general, se observa que además de *AR* mismo, dos de los genes que presentaron mutaciones destacadas codifican productos proteicos que interactúan de manera directa con el AR. Particularmente *FOXO1*, un corepresor que actúa de manera directa con el AR presentó un alto porcentaje de muestras tumorales mutadas. Por su parte, *SPOP*, un regulador directo de los niveles de *AR*, presentó un alto número de mutaciones exclusivas de muestras tumorales, cuatro de ellas con un alto pronóstico deletéreo.

Los otros dos genes destacados en los análisis realizados (*MTOR* y *TP53*), son pleiotrópicos, por lo que las variantes en su funcionamiento pueden estar involucrados en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo de manera no exclusiva a la vía del AR.



Genes con alto porcentaje de muestras tumorales mutadas



Genes con mayor número de mutaciones exclusivas en muestras tumorales



Genes con mayor número de mutaciones con potencial efecto deletéreo

Figura 21. Genes con mutaciones relevantes y su relación con la vía del AR. Representación gráfica de los productos proteicos de los genes que presentaron mutaciones destacadas. Mediante el presente esquema se busca visualizar como dichas mutaciones pueden afectar de manera global la vía de señalización del AR.

Reportes en otros estudios

Se realizó una búsqueda informática en COSMIC [cancer.sanger.ac.uk] y ClinVar [ncbi.nlm.nih.gov], sobre los reportes de las mutaciones encontradas en nuestro estudio que estuvieran presentes otras poblaciones, además de su posible asociación a CaP en otras poblaciones o diferentes tipos de cáncer (Anexo 1). Después de la búsqueda bibliográfica se encontró que 14 de las mutaciones encontradas en el presente estudio, tienen reportes de asociación con cáncer en otras poblaciones, lo cual quiere decir que un 27.4% de las mutaciones encontradas ya habían sido reportadas en otros estudios. Por su parte, el 72.6% de las mutaciones encontradas en el presente estudio no se han reportado en otras poblaciones para ningún tipo de cáncer.

A continuación, se desglosan los genes y sus respectivas mutaciones que tuvieron importancia en otros estudios y que se encontraron en el presente estudio.

Reportes de mutaciones de *TP53* en otros estudios

TP53 fue uno de los genes con el más alto número de muestras mutadas (Figura 7). Las mutaciones p.His193Pro, p.Pro72Arg y Arg306Ter han sido reportadas en otros estudios como asociándolas a diferentes tipos de cáncer (Anexo 1). El presente estudio es el primero hasta lo que se conoce en asociar dichas mutaciones a CaP. Cabe destacar el caso particular de la mutación p.Pro72Arg, que presentó una alta incidencia tanto en las muestras Tumorales como en las No Tumorales. A pesar de su alta incidencia en muestras No Tumorales y de tener un pronóstico no deletéreo (Tabla 4), la mutación se ha asociado a diversos tipos de cáncer en otras poblaciones (Anexo 1).

Reportes de mutaciones de *AR* en otros estudios

AR fue uno de los genes con el mayor número de mutaciones no reportadas en otros estudios. Sin embargo, p.Gln58Leu la mutación que se encontró con mayor frecuencia en *AR* en el presente estudio, ha sido asociada a diferentes tipos de

cáncer en otros reportes, el presente es el primer estudio, hasta lo que se conoce, en asociar dicha mutación a CaP.

La mutación p.Leu57Gln, encontrada en el presente estudio, ha sido asociada a cáncer de mama, endometrio y cerebro en otros reportes. El presente es el primer estudio, hasta lo que se conoce, en asociar la mutación a CaP.

Reportes de mutaciones de *SPOP* en otros estudios

Dentro de la población de mutaciones reportadas en otros estudios, destacan las mutaciones observadas en *SPOP*, debido a que los reportes encontrados para otras poblaciones reportaron asociaciones exclusivamente con CaP. Los reportes encontrados fueron realizados en poblaciones de origen asiático. El presente es el primer estudio en asociar las mutaciones encontradas a CaP en una población mexicana.

DISCUSIÓN

Variables clínicas entre ambos grupos

Se utilizaron tres variables clínicas para comparar a los dos grupos de estudio: la mediana de edad, los niveles séricos de PSA y la mediana del índice de masa corporal de ambos grupos (Tabla 1). No se encontró una diferencia significativa entre las medianas de edades de ambos grupos. Ambas medianas se encuentran por encima del valor de corte en la edad, que se considera como factor de riesgo de la enfermedad (> 40 años).

Al comparar el promedio de los niveles de proteína sérica del PSA (Tabla 1), se observó que las muestras no tumorales presentan una mediana de 10.5 ng/mL. Valor que se encuentra en el límite superior de la clasificación de “intermedio” del PSA en sangre. Por su parte, las muestras tumorales presentaron una mediana de PSA de 305 ng/mL. Valor que se considera “altamente sospechoso”, como criterio de diagnóstico de CaP. Esta comparación nos permitió observar que en promedio los pacientes diagnosticados con la enfermedad presentaron niveles séricos de PSA hasta 30 veces más elevados que los pacientes que no fueron diagnosticados con CaP.

La tercera variable que se comparó entre ambos grupos fue la del índice de masa corporal (IMC). Al comparar ambos grupos observamos que no existe una diferencia significativa entre las medianas calculadas (Tabla 1). De acuerdo con la escala de valores establecidos por la Organización Mundial de la Salud, ambas poblaciones tienen un peso promedio que se categoriza como un estado de pre-obesidad.

Variables clínicas de pacientes con CaP

Se analizaron cuatro variables clínicas para los pacientes que fueron diagnosticados con CaP, es decir para los pacientes cuyas muestras fueron clasificadas como Tumorales (Tabla 1).

Al analizar los valores en la escala de Gleason de los pacientes diagnosticados con CaP, encontramos que el 40.3% tuvo una calificación en la escala igual a 7, valor que equivale a un riesgo intermedio de desarrollar un cáncer de próstata agresivo. Por su parte, un 50% de los pacientes obtuvieron una calificación de Gleason mayor a 7, valores que describen un tipo de cáncer agresivo y con posibilidades altas de expandirse rápidamente. En conjunto, podemos notar que el 90.3% de los pacientes diagnosticados con CaP se encontraron en un estadio avanzado de la enfermedad de acuerdo al valor en la escala de Gleason que les fue asignado.

Adicionalmente se calculó el porcentaje de pacientes que presentaron señales de invasión perineural, así como los que presentaron algún tipo de metástasis. Ambas variables clínicas son indicadores de la agresividad de la enfermedad, ya que los tumores invasivos y metastásicos se consideran altamente agresivos y tienen un mal pronóstico. Al analizar ambas variables, se dedujo que la gran mayoría de los pacientes presentaron un tipo de cáncer agresivo. El 74.5% de ellos presentó señales de invasión perineural. El 38% de los pacientes presentó algún tipo de metástasis. Los resultados evidencian que la existencia de señales de invasión perineural no están siempre acompañadas con algún tipo de metástasis.

Se calculó el porcentaje de pacientes que presentaban adicción al tabaco, alcohol o a ambas sustancias. Los resultados obtenidos demostraron que la adicción al alcohol es la más común en los pacientes, ya que el 20.4% de ellos la presentaron. Mientras que el 40.7% de los pacientes, presentaron adicción al tabaco y al alcohol en combinación. Por lo cual se dedujo que el 61.1% de los pacientes presentó por lo menos adicción al alcohol (Tabla 1).

Genes con el mayor número de muestras mutadas

Para conocer los genes mayormente mutados en CaP para nuestra población, enfocamos nuestro análisis en las mutaciones funcionales. Es decir, en todas aquellas mutaciones que realizan algún cambio en la secuencia de aminoácidos del producto proteico del gen (*missense*, *nonsense*, cambios en el marco de

lectura por inserciones o deleciones). Dichas mutaciones se separaron del resto para analizarlas, y se dividieron dependiendo del grupo del que provenían las muestras (Tumorales y No Tumorales).

El número de muestras con mutaciones funcionales se cuantificaron por cada gen y se separaron en los dos grupos de estudio (Fig. 4). Al graficar esta cuantificación, se evidenció que la mayoría de las mutaciones funcionales pertenecen al grupo de muestras Tumorales. A excepción de los genes *NCOR1* y *TMPRSS2*, el resto de los genes secuenciados presentaron mayor número de mutaciones en el grupo de las muestras tumorales. La Figura 4 muestra que los genes con el mayor número de mutaciones fueron *TP53*, *AR* y *FOXO1*, en ese orden. En los tres casos, las muestras Tumorales presentaron un número significativamente mayor de muestras mutadas. Cabe destacar que el gen del *AR* es el que presenta mayor diferencia en el número de muestras mutadas entre ambos grupos de estudio.

Tipos de variantes encontradas en las muestras tumorales

Se analizaron el tipo de variantes funcionales encontradas en las muestras Tumorales por cada gen, así como el porcentaje de muestras Tumorales que presentaron algún tipo de mutación funcional en cada uno de los genes secuenciados (Figura 5). La representación gráfica de dichas variantes denota que el tipo predominante de mutación funcional en las muestras tumorales es el de mutación *missense*, la cual es una variante puntual, que provoca un cambio de aminoácido no redundante en el producto proteico del gen. La frecuencia del resto de las mutaciones es relativamente baja en comparación con la de las mutaciones *missense*. Muy pocas muestras presentaron más de un tipo de mutación por gen.

Utilizando como criterio de evaluación la frecuencia de las muestras Tumorales mutadas por cada gen, podemos notar que los genes mayormente afectados son *TP53*, *FOXO1*, *AR* y *TMPRSS2*. Estos resultados son congruentes con lo reportado en otros estudios. Se ha reportado que *TP53* es uno de los genes mayormente mutados en pacientes diagnosticados con CaP con porcentajes de incidencia de hasta el 53%²¹. Diversos reportes señalan al *AR* como uno de los

genes mayormente mutados, principalmente en CaP avanzados⁶⁶, como los de nuestra población de estudio. *TMPRSS2* es otro gen comúnmente reportado con alta incidencia mutacional en CaP. Esto se debe en gran medida a la presencia de la fusión *TMPRSS2-ERG*, la cual se ha reportado en 40-50% de casos de CaP²². Nuestros resultados demuestran que *TMPRSS2* es también uno de los genes más afectados por mutaciones puntuales. El porcentaje de mutaciones en *FOXO1* no es tan alto como en otros estudios, sin embargo, se ha comprobado que hasta el 30% de los casos de CaP presentan pérdida del gen completo⁸¹.

Mutaciones exclusivas de muestras tumorales

Para visualizar cuales mutaciones fueron encontradas específicamente en células cancerosas, se realizó una comparación de las mutaciones encontradas en ambos grupos de muestras (Figuras 6-19). Luego, se separaron y cuantificaron las mutaciones que se encontraron exclusivamente en muestras Tumorales (Figura 20). Lo anterior evidenció que a pesar de que *TP53*, *FOXO1* y *TMPRSS2* fueron los genes con el mayor número de muestras Tumorales mutadas, no presentan un gran número de mutaciones exclusivas de células cancerosas. Caso contrario al de *AR*, el cual es el tercer gen con el mayor número de muestras Tumorales mutadas y el gen con el mayor número de mutaciones exclusivas en CaP.

La elevada incidencia de pacientes con mutaciones en el *AR* y la alta especificidad de sus mutaciones en la población Tumoral, coinciden con los reportes en otros estudios que indican que las mutaciones en el *AR* son características en CaP de estadios avanzados como los de nuestra población de estudio²². Por su parte, *MTOR* y *SPOP* resultaron ser genes con una incidencia media en el porcentaje de muestras Tumorales mutadas. Pero a su vez presentaron un número alto de mutaciones solamente presentes en muestras Tumorales. Esto parece indicar que son genes que se ven afectados durante el desarrollo de la enfermedad y no en etapas previas de la misma.

Por otro lado, se encontraron variantes que resultaron ser de alta incidencia en ambos grupos de nuestro estudio. Este es el caso de p.Pro72Arg en *TP53* (Figura 7), observado en el 84.4% de las muestras Tumorales y en el 93.8% de las No

Tumorales. El valor clínico de la variante en CaP se desconoce. Existen reportes que asocian a la variante con resistencia a diferentes tratamientos, incluyendo Paclitaxel en cáncer gástrico. La presencia de mutaciones similares en frecuencia a ésta puede interpretarse de dos diferentes maneras:

- A. Las mutaciones con alta incidencia en ambos grupos de muestras son variantes características de la población de estudio y no tienen un papel en el desarrollo de la enfermedad.
- B. Las variantes con alta incidencia en ambos grupos son mutaciones de predisposición para el desarrollo de CaP y su presencia se puede considerar un alelo de riesgo.

La información del presente estudio no es suficiente para determinar el valor clínico de la enfermedad y apoyar alguna de las dos interpretaciones, por lo que se requieren mayores estudios al respecto.

Mutaciones con una correlación estadística positiva con niveles elevados de APE en sangre

En la tabla 3 se muestran las mutaciones funcionales que presentaron una correlación estadística con el nivel de APE sanguíneo. Para los grupos que presentaron alguna de las cuatro mutaciones descritas en la tabla 3, se encontró que las muestras cuyo genotipo es distinto al silvestre presentaron una media de niveles de APE mayor a la media de los niveles de APE presentes en las muestras con genotipo silvestre.

Es destacable el caso de la mutación Phe133Ser de *SPOP* en el que el grupo con el genotipo mutante presentó una media del nivel de APE de un orden cien veces mayor al de la media del nivel de APE del grupo con el genotipo silvestre.

Como se observa en la Figura 2 la actividad correpresora de FOXO1 y la actividad de ubiquitinación de SPOP regulan la activación del AR y por lo tanto los niveles de expresión de diversas proteínas incluyendo APE. La correlación estadística descrita en la tabla 3 podría sugerir que las mutaciones encontradas en *FOXO1* y *SPOP* reducen la actividad biológica de sus productos proteicos promoviendo así la activación de la vía AR y aumentando la expresión de APE. Se requiere mayor evidencia experimental para corroborar dichas hipótesis.

La posible implicación biológica de la mutación encontrada en *TP53* en la vía AR es más complicada de dilucidar ya que como se observa en la Figura 2, la proteína p53 regula la vía del AR de manera indirecta al inhibir a MDM2 quien a su vez degrada al AR, por lo que la mutación encontrada en *TP53* podría potencialmente favorecer la inhibición de MDM2, disminuyendo así la degradación de AR y aumentando su actividad.

Debido a que *TMPRSS2* no regula en ningún nivel la vía del AR como se observa en la Figura 2, la mutación encontrada en *TMPRSS2* difícilmente podría representar una variante de implicación biológica para la vía del AR.

Predicciones de impacto funcional

Las mutaciones encontradas en las muestras Tumorales fueron procesadas con un predictor *in silico* del impacto funcional de la mutación sobre la proteína. Encontramos que las mutaciones *missense* con un mayor valor predictivo de ser deletéreas, se encontraron en los genes *SPOP* y *MTOR*, genes que además demostraron una especificidad mutacional en tejido tumoral.

Los resultados del presente estudio coinciden con los reportes que indican que las mutaciones en *SPOP* son características de CaP⁶². De igual manera, el elevado valor predictivo del impacto funcional de dichas mutaciones coincide con los reportes que indican que las mutaciones que disminuyen la actividad proteica en *SPOP*, favorecen el desarrollo de fenotipos prostáticos malignos¹⁷. Se ha demostrado que cuando *SPOP* no funciona de manera adecuada los niveles proteicos del AR son más elevados, esto se debe a que *SPOP* regula directamente los niveles del AR degradándolo mediante señalización por ubiquitinación (Figura 2)¹⁷, se requieren realizar estudios que confirmen la capacidad deletérea de las mutaciones encontradas en *SPOP* y su relación con los niveles proteicos y la actividad del AR.

Los resultados encontrados para *MTOR* presentan una mayor dificultad en su interpretación. A pesar de ser un gen que presentó mutaciones específicamente en tejido tumoral y con un alto valor predictivo de impacto funcional, *MTOR* es un gen policistrónico y las alteraciones en su funcionamiento pueden afectar a un gran número de procesos celulares (regulación del crecimiento celular, inmunidad y metabolismo entre otros). La interacción entre

mTOR y AR es de tipo indirecta (Figura 2). Las mutaciones encontradas en *MTOR* pueden influenciar en el desarrollo de CaP de formas diversas, que incluso pueden no guardar relación directa con la vía del AR. Se ha reportado que en diversos tipos de cáncer *MTOR* presenta mutaciones que sobre expresan vías de proliferación y diferenciación celular⁷⁰. En el caso de su relación con la vía canónica del AR, las mutaciones en *MTOR* podrían afectar la actividad del corepresor FOXO1 y de la ligasa MDM2, encargada de la degradación del AR.

Un caso particularmente interesante es el de la mutación p.Pro72Arg en *TP53*, que presentó un alto valor predictivo de impacto funcional, hecho que está corroborado con los reportes que indican que la presencia de dicha mutación confiere resistencia al tratamiento con Paclitaxel en cáncer gástrico. El alto valor predictivo de impacto funcional no se ha confirmado en tejido de CaP, tampoco se ha descrito el posible mecanismo mediante el cual dicha mutación pudiera afectar el desarrollo de CaP.

La mutación p.His193Pro resultó ser otra destacada para *TP53*, observada en dos muestras Tumorales. Tuvo una predicción deletérea y ha sido asociada a diversos tipos de cáncer en otros estudios (Anexo 1).

Genes con mutaciones relevantes en la vía de señalización del AR

Tomando en consideración los genes que presentaron mayor porcentaje de muestras mutadas, se intentó dilucidar cuales mecanismos celulares fueron mayormente afectados en las muestras Tumorales. Al señalar los productos proteicos de los genes mayormente mutados en las muestras Tumorales, se observó que todos forman parte de la vía de acción canónica del AR. Por su parte, los genes involucrados en la vía de regulación de la traducción y en la síntesis de andrógenos se vieron menormente afectados (Figura 21). Exceptuando a *SPOP*, los productos proteicos de los genes mayormente mutados interactúan con el AR de manera directa o indirecta dentro del compartimiento nuclear (Figura 21).

Considerando además de su alto número de mutaciones y el número de mutaciones exclusivas de muestras Tumorales, los genes más destacados se reducen a *SPOP*, *MTOR* y *AR* (Figura 21). Esto sugiere que, en nuestra población

de estudio, estos genes se encuentran afectados en condiciones de CaP desarrollado. Pero no se encuentran afectados en las etapas previas al desarrollo de CaP.

En el contexto de predicción de mutaciones deletéreas con un modelo *in silico*, observamos que los genes con el mayor número de mutaciones potencialmente deletéreas son *MTOR* y *SPOP*. Mientras que las mutaciones en *MTOR* pueden implicar alteraciones en distintas vías, las mutaciones deletéreas en *SPOP* pueden influir directamente en la regulación de los niveles proteicos del AR. La presencia de proteínas de *SPOP* truncas o con baja actividad enzimática, podrían tener como consecuencia aumento en los niveles normales del AR

De manera global podemos observar que, los genes con las mutaciones más destacadas en este estudio pueden separarse en dos categorías distintas:

- Aquellas presentes en genes policistrónicos y cuyas variantes pueden tener consecuencias en diferentes procesos biológicos, como *TP53* y *MTOR*.
- Mutaciones presentes en genes estrechamente relacionados a la vía canónica del AR como *FOXO1*, *SPOP* y *AR* mismo.

Reportes en otros estudios

El 72.6% de las mutaciones encontradas en el presente estudio no han sido reportadas en otras poblaciones, ni han sido asociadas a otros tipos de cáncer, lo cual puede deberse a que la profundidad de secuenciación que se logró con la metodología utilizada permitió encontrar mutaciones que no pudieron ser detectadas en otros estudios con diferentes metodologías. La baja incidencia de mutaciones reportadas en otros estudios puede deberse también a que las encontradas en el presente son mutaciones específicas de la población de estudio a pesar de su baja frecuencia.

Las mutaciones encontradas en *TP53* han sido reportadas en una gran variedad de poblaciones y tipos de cáncer. Esto puede deberse a que el producto proteico del gen está involucrado en otros procesos celulares. Las mutaciones presentes en p53 pueden afectar diferentes vías de señalización, por lo que es difícil concluir que las mutaciones encontradas en el presente estudio, sean mutaciones específicas para CaP o para nuestra población de estudio en particular.

La mutación p.Gln58Leu encontrada en *AR* ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer pero no en CaP. A pesar de que la mutación se encontró tanto en muestras tumorales como en muestras no tumorales (Figura 6), es una mutación que se ha asociado a cáncer de mama, pulmón e intestinos. Adicionalmente, la mutación obtuvo un pronóstico de probablemente deletérea (Tabla 4). Por todo lo anterior, es importante considerar a la mutación señalada como una potencial candidata a estudiarse con mayor profundidad en CaP.

Dentro de las mutaciones reportadas en otras poblaciones destacan las encontradas en *SPOP*, debido a que todos los reportes encontrados para otras poblaciones fueron reportes de CaP. Esto podría indicar que las mutaciones presentes en este gen son específicas para CaP, pero que no son específicas de una población en particular. Así, las mutaciones descritas para *SPOP* en el presente estudio son excelentes candidatas para ser sometidas a estudios complementarios que puedan revelar más sobre su rol en el desarrollo de CaP.

Variantes encontradas en muestras no tumorales

Las muestras clasificadas como No Tumorales presentaron mutaciones que no fueron consideradas para la mayoría de los análisis del presente estudio. A pesar de ser clasificadas como muestras No Tumorales, estos tejidos fueron recolectados de pacientes con cuadros sospechosos de CaP, que en una última instancia fueron descartados por el diagnóstico patológico. Debido a lo anterior, las mutaciones encontradas en estas muestras pudieran estar asociadas a estadios previos al desarrollo de CaP.

Las mutaciones encontradas en muestras Tumorales y No Tumorales se utilizaron como criterio de exclusión para considerar como mutaciones asociadas a CaP, únicamente a las mutaciones que no se presentaron en las muestras no tumorales. Las mutaciones encontradas en muestras tumorales pudieran tener un valor clínico de predisposición a CaP, sin embargo es un enfoque que se encuentra fuera de los objetivos del presente estudio, por lo que se requieren estudios adicionales para comprobar el potencial valor clínico de las mutaciones encontradas.

Debido a que las variantes encontradas en tejido prostático no pudieron ser pareadas con secuencias de DNA provenientes de tejido sano de los mismos individuos (por ejemplo, sangre periférica), y por ser el presente un estudio retrospectivo de muestras tomadas, las variantes encontradas no pueden ser diferenciadas de un polimorfismo específico de los individuos que formaron parte del estudio. En las muestras tumorales se encontraron 45 de las 57 variantes funcionales encontradas en el total de la población de estudio, es decir se encontraron presentes el 79% de las mutaciones funcionales reportadas en el presente estudio. Debido a esto, se requieren de estudios adicionales que revelen la posible relación de las mutaciones encontradas, con el desarrollo de CaP.

CONCLUSIONES

- ✓ Los genes que se encontraron mayormente mutados exclusivamente en muestras Tumorales para nuestra población de estudio fueron *AR*, *SPOP* y *MTOR*. Las mutaciones: p.Phe102Cys, p.Phe102Val, p.Phe133Cys, p.Phe133Ser, p.Phe133Val y p.Leu157Phe encontradas en *SPOP* son específicas de CaP pero no de nuestra población.
- ✓ Los genes con las mutaciones más destacadas codifican para proteínas que afectan en dos maneras a la vía de señalización del AR: interactuando de manera directa con el AR o de manera indirecta mediante proteínas que regulan diversos procesos celulares.
- ✓ La mayoría de las mutaciones encontradas no han sido reportadas en otros estudios. Las mutaciones que replicaron lo reportado en otros estudios se encontraron principalmente en *SPOP* (p.Phe102Cys, p.Phe102Val, p.Phe133Cys, p.Phe133Ser, p.Phe133Val y p.Leu157Phe) y en *TP53* (p.Pro72Arg , p.His193Pro, p.Pro72Ala, p.Arg306Ter, p.Arg175His, p.Phe270Ile).

REFERENCIAS

1. Cunha, G. R. *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* **8**, 338–362 (1987).
2. Poiani, A. Complexity of seminal fluid: A review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **60**, 289–310 (2006).
3. Ittmann, M. Anatomy and histology of the human and murine prostate. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
4. Peter, A., Lilja, H., Lundwall, Å. & Malm, J. Semenogelin I and semenogelin II, the major gel-forming proteins in human semen, are substrates for transglutaminase. *Eur. J. Biochem.* **252**, 216–221 (1998).
5. Flier, J. S., Underhill, L. H. & Griffin, J. E. Androgen Resistance — The Clinical and Molecular Spectrum. *N. Engl. J. Med.* **326**, 611–618 (1992).
6. Nakamura, Y. *et al.* Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in the adrenal reticularis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 2192–2198 (2009).
7. Ferraldeschi, R., Welti, J., Luo, J., Attard, G. & De Bono, J. S. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: Progresses and prospects. *Oncogene* **34**, 1745–1757 (2014).
8. Deslypere, J. P., Young, M., Wilson, J. D. & McPhaul, M. J. Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **88**, 15–22 (1992).
9. Smith, D. F. & Toft, D. O. Minireview: The Intersection of Steroid Receptors with Molecular Chaperones: Observations and Questions. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2229–2240 (2008).
10. Thadani-Mulero, M., Nanus, D. M. & Giannakakou, P. Androgen receptor on the move: Boarding the microtubule expressway to the nucleus. *Cancer Res.* **72**, 4611–4615 (2012).
11. Berrevoets, C. A., Doesburg, P., Steketee, K., Trapman, J. & Brinkmann, A. O. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the

- human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). *Mol. Endocrinol.* **12**, 1172–1183 (1998).
12. Doesburg, P. *et al.* Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor. *Biochemistry* **36**, 1052–1064 (1997).
 13. Claessens, F. *et al.* Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **76**, 23–30 (2001).
 14. Depriest, A. D. *et al.* Regulators of androgen action resource: A one-stop shop for the comprehensive study of androgen receptor action. *Database* **2016**, 1–11 (2016).
 15. Heemers, H. V. & Tindall, D. J. Unraveling the Complexities of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Cancer Cell* **15**, 245–247 (2009).
 16. Agoulnik, I. U. & Weigel, N. L. Coactivator selective regulation of androgen receptor activity. *Steroids* **74**, 669–674 (2009).
 17. An, J., Wang, C., Deng, Y., Yu, L. & Huang, H. Destruction of Full-Length Androgen Receptor by Wild-Type SPOP, but Not Prostate-Cancer-Associated Mutants. *Cell Rep.* **6**, 657–669 (2014).
 18. Giridhar, P. V., Williams, K., VonHandorf, A. P., Deford, P. L. & Kasper, S. Constant degradation of the androgen receptor by MDM2 conserves prostate cancer stem cell integrity. *Cancer Res.* **79**, 1124–1137 (2019).
 19. Labrie, F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. *Nat. Rev. Urol.* **8**, 73–80 (2011).
 20. Scher, H. I., Buchanan, G., Gerald, W., Butler, L. M. & Tilley, W. D. Targeting the androgen receptor: Improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 459–476 (2004).
 21. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
 22. Taylor, B. S. *et al.* Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer.

- Cancer Cell* **18**, 11–22 (2010).
23. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).
 24. Chen, C. D. *et al.* Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**, 33–39 (2004).
 25. Centenera, M. M., Selth, L. A., Ebrahimie, E., Butler, L. M. & Tilley, W. D. New Opportunities for Targeting the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a030478 (2018).
 26. Heemers, H. V. & Tindall, D. J. Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr. Rev.* **28**, 778–808 (2007).
 27. Tomlins, S. A. *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science (80-.)*. **310**, 644–648 (2005).
 28. Tomlins, S. A. *et al.* ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *Eur. Urol.* **56**, 275–286 (2009).
 29. Humphrey, P. A. Histopathology of prostate cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, 1–22 (2017).
 30. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
 31. Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M. & Mucci, L. A. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a030361 (2018).
 32. Ukimura, O. *et al.* Contemporary Role of Systematic Prostate Biopsies: Indications, Techniques, and Implications for Patient Care. *Eur. Urol.* **63**, 214–230 (2013).
 33. Thompson, I. M. *et al.* Assessing prostate cancer risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 529–534 (2006).
 34. Uzzo, R. G. *et al.* Free prostate-specific antigen improves prostate cancer detection in a high-risk population of men with a normal total PSA and digital rectal examination. *Urology* **61**, 754–759 (2003).
 35. Sandhu, G. S. & Andriole, G. L. Overdiagnosis of prostate cancer. *J. Natl.*

- Cancer Inst. - Monogr.* **2011**, 146–151 (2012).
36. Gleason, D. F. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum. Pathol.* **23**, 273–279 (1992).
 37. Capurso, C. & Vendemiale, G. The Mediterranean Diet Reduces the Risk and Mortality of the Prostate Cancer: A Narrative Review. *Front. Nutr.* **4**, (2017).
 38. Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Chan, J. M., Giovannucci, E. & Author, J. Smoking and Prostate Cancer Survival and Recurrence NIH Public Access Author Manuscript. *Jama* **305**, 2548–2555 (2011).
 39. Cao, Y. & Ma, J. Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev. Res.* **4**, 486–501 (2011).
 40. Giovannucci, E., Liu, Y., Platz, E. A., Stampfer, M. J. & Willett, W. C. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int. J. Cancer* **121**, 1571–1578 (2007).
 41. Boffetta, P. *et al.* The causes of cancer in France. *Ann. Oncol.* **20**, 550–555 (2009).
 42. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
 43. Rebbeck, T. & Haas, G. Temporal trends and racial disparities in global prostate cancer prevalence. *Cancer J. Urol.* **25**, 289–313 (2016).
 44. Rebbeck, T. R. Prostate cancer disparities by race and ethnicity: From nucleotide to neighborhood. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–16 (2018).
 45. Chang, B. *et al.* UKPMC Funders Group Validation of Genome-Wide Prostate Cancer Associations in Men of African Descent. *Biomarkers* **20**, 23–32 (2011).
 46. Yaeger, R. *et al.* Comparing genetic ancestry and self-described race in African Americans born in the United States and in Africa. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1329–1338 (2008).

47. Giri, V. N. *et al.* Race, genetic west African ancestry, and prostate cancer prediction by prostate-specific antigen in prospectively screened high-risk men. *Cancer Prev. Res.* **2**, 244–250 (2009).
48. Hsing, A. W. *et al.* High prevalence of screen detected prostate cancer in West Africans: Implications for racial disparity of prostate cancer. *J. Urol.* **192**, 730–736 (2014).
49. Jayadevappa, R., Chhatre, S., Johnson, J. C. & Malkowicz, S. B. Association between ethnicity and prostate cancer outcomes across hospital and surgeon volume groups. *Health Policy (New York)*. **99**, 97–106 (2011).
50. Hamilton, R. J. *et al.* Race, biochemical disease recurrence, and prostate-specific antigen doubling time after radical prostatectomy: Results from the SEARCH database. *Cancer* **110**, 2202–2209 (2007).
51. Barocas, D. A. *et al.* Association between race and follow-up diagnostic care after a positive prostate cancer screening test in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian cancer screening trial. *Cancer* **119**, 2223–2229 (2013).
52. Lichtenstein, P. *et al.* Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**, 78–85 (2000).
53. Verhage, B. A. J. *et al.* Site-specific familial aggregation of prostate cancer. *Int. J. Cancer* **109**, 611–617 (2004).
54. K., H. & K., C. Attributable risks of familial cancer from the family-cancer database. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 1638–1644 (2002).
55. Brandt, A., Sundquist, J. & Hemminki, K. Risk for incident and fatal prostate cancer in men with a family history of any incident and fatal cancer. *Ann. Oncol.* **23**, 251–256 (2012).
56. Breyer, J. P., Avritt, T. G., McReynolds, K. M., Dupont, W. D. & Smith, J. R. Confirmation of the HOXB13 G84E Germline Mutation in Familial Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 1348–1353 (2012).
57. Berry, R. *et al.* Linkage Analyses at the Chromosome 1 Loci 1q24-25 (HPC1), 1q42.2-43 (PCAP), and 1p36 (CAPB) in Families with Hereditary

- Prostate Cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 539–546 (2002).
58. Ledet, E. M., Sartor, O., Rayford, W., Bailey-Wilson, J. E. & Mandal, D. M. Suggestive evidence of linkage identified at chromosomes 12q24 and 2p16 in African American prostate cancer families from Louisiana. *Prostate* **72**, 938–947 (2012).
 59. Brown, W. M. *et al.* Hereditary prostate cancer in African American families: Linkage analysis using markers that map to five candidate susceptibility loci. *Br. J. Cancer* **90**, 510–514 (2004).
 60. Pomerantz, M. M. & Freedman, M. L. Genetics of Prostate Cancer Risk. *Mt. Sinai J. Med. A J. Transl. Pers. Med.* **77**, 643–654 (2010).
 61. Shui, I. M. *et al.* Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the national cancer institute breast and prostate cancer cohort consortium. *Eur. Urol.* **65**, 1069–1075 (2014).
 62. Eeles, R. A. *et al.* Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat. Genet.* **45**, 385–391 (2013).
 63. Al Olama, A. A. *et al.* A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat. Genet.* **46**, 1103–1109 (2014).
 64. Castro, E. *et al.* Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1748–1757 (2013).
 65. Sun, T. *et al.* Aggressiveness of Prostate Cancer in a Caucasian Population. **16**, 5244–5251 (2011).
 66. Taplin, M. E. *et al.* Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1393–1398 (1995).
 67. Dias, A., Kote-Jarai, Z., Mikropoulos, C. & Eeles, R. Prostate cancer germline variations and implications for screening and treatment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
 68. Kote-Jarai, Z. *et al.* Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: The PRACTICAL consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 2052–2061 (2008).

69. Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M. & Zhang, R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J. Biomed. Res.* **27**, 254–271 (2013).
70. Hua, H. *et al.* Targeting mTOR for cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 71 (2019).
71. D'Abronzo, L. S. *et al.* The androgen receptor is a negative regulator of eIF4E phosphorylation at S209: Implications for the use of mTOR inhibitors in advanced prostate cancer. *Oncogene* **36**, 6359–6373 (2017).
72. Montgomery, R. B. *et al.* Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth. *Cancer Res.* **68**, 4447–4454 (2008).
73. Culig, Z. & Santer, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 413–427 (2014).
74. Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Paliouras, M. & Trifiro, M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum. Mutat.* **33**, 887–894 (2012).
75. Thomas, L. N. *et al.* Type 1 and Type 2 5 α -Reductase Expression in the Development and Progression of Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **53**, 244–252 (2008).
76. Makridakis, N. M. *et al.* Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* **354**, 975–978 (1999).
77. Abeshouse, A. *et al.* The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **163**, 1011–1025 (2015).
78. Blattner, M. *et al.* SPOP Mutations in Prostate Cancer across Demographically Diverse Patient Cohorts. *Neoplasia* **16**, 14-W10 (2014).
79. Knudsen, K. E. & Schrecengost, R. E. Molecular Pathogenesis and Progression of Prostate Cancer R.S. *Semin. Oncol.* **40**, 244–258 (2013).
80. Ferraldeschi, R. *et al.* Second-Generation HSP90 Inhibitor Onalespib Blocks mRNA Splicing of Androgen Receptor Variant 7 in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **76**, 2731–2742 (2016).
81. Dong, X. Y. *et al.* FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor

- gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* **66**, 6998–7006 (2006).
82. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 685–689 (2012).
 83. Tan, P. Y. *et al.* Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 399–414 (2012).
 84. Huang, F. W. *et al.* Exome Sequencing of African-American Prostate Cancer Reveals Loss-of-Function ERF Mutations. *Cancer Discov.* **7**, 973–983 (2017).
 85. Arora, K. & Barbieri, C. E. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **20**, 58 (2018).
 86. Graff, J. R. *et al.* eIF4E activation is commonly Elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res.* **69**, 3866–3873 (2009).
 87. Stoyanova, T. *et al.* Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20111–20116 (2013).
 88. Furic, L. *et al.* eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14134–14139 (2010).

{

MATERIAL ADICIONAL

Anexo 1. Reportes en otros estudios de las variantes encontradas

Gen	Cambio en el DNA	Cambio en la proteína	Estatus (Nueva/Reportada)	Clinvar (Código de acceso)	Cosmic ID	Tipo de Cáncer
<i>NCOR1</i>	c.448G>A	p.Gly150Arg	Reportada	Sin reportes	COSM249685	Vejiga, colorrectal
<i>NCOR1</i>	c.4805A>G	p.Gln1602Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>SPOP</i>	c.305T>G	p.Phe102Cys	Reportada	VCV000161486.1	COSM220066	Próstata
<i>SPOP</i>	c.304T>G	p.Phe102Val	Reportada	VCV000376546	COSM4393128	Próstata
<i>SPOP</i>	c.398T>C	p.Phe133Cys	Reportada	SCV000507425.1	COSM242645	Próstata
<i>SPOP</i>	c.397T>G	p.Phe133Ser	Reportada	SCV000507426.1	COSM247573	Próstata
<i>SPOP</i>	c.478G>A	p.Phe133Val	Reportada	SCV000507424.1	COSM219965	Próstata
<i>SPOP</i>	c.469C>T	p.Leu157Phe	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>TMPRSS2</i>	c.578A>C	p.Val160Met	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	Reportada	VCV000012351.1	COSM242645	Resistencia a Paclitaxel en: Neoplasmas, Neutropenia, Ovario, Estomago y Cuello
<i>TP53</i>	c.578A>C	p.His193Pro	Reportada	SCV000508526.1 SCV000508527.1 SCV000508529.1 SCV000508532.1 SCV000508528.1 SCV000508533.1 SCV000508534.1 SCV000508536.1 SCV000508537.1 SCV000508539.1 SCV000508545.1	COSM43833	Intestino, Páncreas, Próstata, Esófago, Leucemia, Estómago, Mama, Pulmón, Útero, Vejiga, Cerebro.
<i>TP53</i>	c.214C>G	p.Pro72Ala	Reportada	VCV000142854.3 SCV000187382.5	COSM3738520	Predisposición a cáncer

						hereditario
<i>TP53</i>	c.916C>T	p.Arg306Ter	Reportada	SCV000505682.1 SCV000505681.1 SCV000923901.1	COSM10663	Intestino grueso, Cabeza y cuello, ovario,
<i>TP53</i>	c.524G>A	p.Arg175His	Reportada	SCV000504891.1 SCV000297733.1 SCV000923920.1 SCV000504892.1		Neoplasma, esófago, ovario, mama.
<i>TP53</i>	c.808T>A	p.Phe270Ile	Reportada	SCV000508107.1 SCV000508108.1 SCV000508109.1 SCV000508110.1 SCV000508112.1 SCV000508113.1 SCV000508114.1 SCV000508115.1		Cabeza, cuello, pulmón, ovario, cerebro, estómago, piel, esófago, mama.
<i>SRD5A2</i>	c.58C>T	p.Leu20Phe	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXA1</i>	c.655C>A	p.Arg219Ser	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXA1</i>	c.1343G>A	p.Ser448Asn	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXA1</i>	c.752_763del el GCAACATG TTCG	p.Gly251_Phe254del	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXA1</i>	c.749_760del el CCGGCAAC ATGT	p.Ser250_Met253del	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXO1</i>	c.1262A>G	p.Tyr421Cys	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>HSP90A1</i>	c.836A>T	p.Lys279Met	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>HSP90A1</i>	c.581A>G	p.Gln194Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MAPK1</i>	c.941A>G	p.Glu314Gly	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>AR</i>	c.203_204insA	p.Gln69fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>AR</i>	c.206_207insA	p.Gln70fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>AR</i>	c.218_219insA	p.Gln74fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>AR</i>	c.227_228insA	p.Gln77fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>AR</i>	c.1981_1982insAAAA	p.Thr661fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes

AR	c.1115C>T	p.Ala372Val	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.92G>A	p.Arg31His	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.173A>T	p.Gln58Leu	Reportada	VCV000417977 VCV000210223	COSM6986099	Mama, pulmón, intestino síndrome de resistencia a andrógenos
AR	c.206A>G	p.Gln69Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.215A>T	p.Gln72Leu	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.61G>A	p.Gly21Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.170T>A	p.Leu57Gln	Reportada	Sin reportes	COSM301687	Mama, endometrio, cerebro
AR	c.289C>T	p.Pro97Ser	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
AR	c.2758C>T	p.Gln920Ter	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>eIF4E</i>	c.144_145d elTA	p.Phe48fs	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>FOXA1</i>	c.1267G>A	p.Ala423Thr	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MDM2</i>	c.848A>G	p.Gln283Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MDM2</i>	c.845A>G	p.Tyr282Cys	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MTOR</i>	c.5705A>T	p.Asp1902Val	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MTOR</i>	c.5903A>G	p.His1968Arg	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MTOR</i>	c.5710C>T	p.Leu1904Phe	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>MTOR</i>	c.4621C>T	p.His1541Tyr	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
<i>NCOR1</i>	c.5066C>T	p.Pro1689Leu	Nueva	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes

Anexo 2. Carta de consentimiento informado.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACIÓN DE PARTICIPACIÓN

1. Datos Generales

Investigador Principal:

Dr. Greco Hernández Ramírez.

Teléfono: 56280433.

Correo electrónico: gherandezr@incan.edu.mx

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

Versión del consentimiento: 2014. Sitio donde se realizará el estudio: INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.

2. Participación voluntaria.

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

Su médico le ha diagnosticado un probable cáncer de próstata, por lo que le estamos invitando a participar en esta investigación para analizar cuales mutaciones en el Receptor de Andrógenos están presentes en pacientes mexicanos con cáncer de próstata. Se espera que participen 50 hombres con esta enfermedad, cuya participación es totalmente voluntaria. El negarse a participar no influirá en el tratamiento al que tiene derecho como paciente de la Institución. Así mismo, el paciente recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento. El investigador se compromete a proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar su voluntad para continuar participando. **3. Información para el Paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento.**

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

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

4. Datos propios del procedimiento: Toma de Biopsias.

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

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

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

5. Beneficios.

Si Usted acepta participar en esta investigación, no recibirá un beneficio directo de

los resultados de este estudio. Sin embargo, si participa en esta investigación podremos conocer cuales son las mutaciones en el material genético que Usted presenta y si alguno de estos cambios podrían estar relacionados con la mejor respuesta a algún tratamiento en particular. Estos datos serán de utilidad en el futuro para poder establecer mejores métodos de tratamiento y de diagnóstico para los hombres mexicanos que desarrollan cáncer de próstata. Cualquier información derivada directa o indirectamente de esta investigación, le será informada.

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

6. Riesgos.

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

7. Procedimientos alternativos.

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

8. Responsabilidades del paciente.

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

9. Confidencialidad.

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

10. Compensación.

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación.

11. Indemnizaciones y pago de eventos adversos.

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

12. Terminación del estudio.

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

13. Personas a contactar.

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

14. Firmas.

Del Paciente:

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

Nombre: _____
Dirección: _____
Teléfono: _____
Fecha: _____

Firma _____

Del Testigo 1:

Nombre: _____
Dirección: _____
Teléfono: _____
Parentesco con el
paciente: _____
Fecha: _____

Firma _____

Del Testigo 2:

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Parentesco con el
paciente: _____

Fecha: _____

Firma _____

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

Nombre: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Firma _____

Anexo 3

Elaboración de la figura 3.

La figura 3 se elaboró mediante el programa *Rscript* utilizando la herramienta *MAF tools*. En la sección de *Rscript* se utilizó el siguiente código:

```
f (!require("BiocManager"))
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("maftools")
laml.maf <- system.file("extdata", "tcga_laml.maf.gz", package = "maftools")
laml <- read.maf(maf = laml.maf)
library("maftools")
laml.maf <- system.file("extdata", "tcga_laml.maf.gz", package = "maftools")
laml <- read.maf(maf = laml.maf)
oncoplot(maf = laml, top = 20, showTumorSampleBarcodes = TRUE, fontSize = 0.3)
oncoplot(maf = laml, top = 20, showTumorSampleBarcodes = TRUE, fontSize = 1)
oncoplot(maf = laml, top = 20, drawRowBar = TRUE)
oncoplot(maf = laml, top = 10)
oncoplot(maf = laml, top = 10, showTumorSampleBarcodes = T)
oncoplot(maf = laml, top = 10, showTumorSampleBarcodes = T)
oncoplot(maf = laml, top = 10, drawRowBar = T, drawColBar = T)
oncoplot(maf = laml, top = 10, drawRowBar = T, drawColBar = F)
if (!require("BiocManager"))
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("maftools")
library("maftools")
laml.maf <- system.file("extdata", "tcga_laml.maf.gz", package = "maftools")
laml <- read.maf(maf = laml.maf)
oncoplot(maf = laml, top = 3)
oncoplot(maf = laml, top = 10)
plot(mtcars)
oncoplot(maf = laml, top = 10)
dev.off()
```



```

oncoplot(maf = lam1, top = 10)
oncoplot(maf = lam1, top = 3)
plot(mtcars)
while (!is.null(dev.list())) dev.off()
plot(mtcars)
oncoplot(maf = lam1, top = 3)
while (!is.null(dev.list())) dev.off()
update.packages(checkBuilt = TRUE)
plot(mtcars)
oncoplot(maf = lam1, top = 3)
plot(mtcars)
while (!is.null(dev.list())) dev.off()
oncoplot(maf = lam1, top = 3)
oncoplot(maf = lam1, top = 20)
while (!is.null(dev.list())) dev.off()
oncoplot(maf = lam1, top = 20)
while (!is.null(dev.list())) dev.off()
oncoplot(maf = lam1, top = 10)
install.packages("rpart")
oncoplot(maf = lam1, top = 5)
if (!require("BiocManager"))
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("maftools")
library("maftools")
lam1.maf <- system.file("extdata", "tcga_lam1.maf.gz", package = "maftools")
lam1 <- read.maf(maf = lam1.maf)
oncoplot(maf = lam1, top = 20)
lam1@data
table <- lam1@data
View(table)
table <- as.matrix(table)
View(table)
setwd("~/Desktop")

```

```

write.csv(table, file="Ejemplo.txt", col.names = F)
Table <- as.data.frame(table)
write.csv(Table, file="Ejemplo.txt", col.names = F)
View(Table)
write.csv(Table, file = "Ejemplo.txt", sep="\", col.names=F)
)
))
write.csv(Table, file = "Ejemplo.txt", sep="\", col.names="F")
write.csv(Table, file = "Ejemplo.txt", sep="\", col.names="F")
write.csv(Table, file=Ejemplo.txt, sep="\", col.names="F")
class(table)
class(Table)
write.csv(table, file="Ejemplo.txt, sep="\", col.names=F)
write.csv(table, file="Ejemplo.txt", sep="\", col.names=F)
)
))
)))
write.csv(table, file="Ejemplo.txt", sep="\", col.names="F")
write.csv(table, file="Ejemplo.txt", sep="\", col.names=FALSE)
write.csv(table, file="Ejemplo.csv", sep="\", col.names=FALSE)
write.csv(table, file="Ejemplo.csv")
setwd("~/Desktop")
write.csv(table, file="Ejemplo.csv")
write.csv(table, file="Ejemplo.csv", col.names = F)
write.csv(table, file="Ejemplo.csv", col.names = False)
datos = read.table("table.txt")
datos = read.table("table.txt", header = T, sep="\")
))
datos = read.table(table.txt, header = T, sep="\")
))
datos <- read.table("table.txt, header = TRUE, sep = "\")
datos <- read.table("table.txt", header = TRUE, sep = "\")
datos <- read.table("table.txt", header = TRUE, sep = "")

```

```
dartos <- read.table("table.txt", header = TRUE, sep = "")
dartos <- read.table("table.txt", header = TRUE, sep = "")
dartos <- read.table("table.txt", header = TRUE)
datos <- read.delim("table.txt", header = TRUE, sep = "\t" )
View(datos)
oncoplot(maf = datos, top = 20)
class(laml@data)
class(datos)
read.maf(datos, clinicalData = NULL)
MAFDat <- read.maf(datos, clinicalData = NULL)
View(MAFDat)
oncoplot(maf = MAFDat, top = 20)
oncoplot(maf = MAFDat, top = 20)
savehistory("~/Desktop/MAFtable.Rhistory")
```