



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTACIONES EN EL GEN POLIBROMO -1 (PBRM1) EN
CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA EN EL DESENLACE
ONCOLÓGICO**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA

ALAN DE JESÚS MARTÍNEZ SALAS

TUTOR

DR FELIPE VADILLO ORTEGA

Instituto Nacional de Medicina Genómica

COMITÉ TUTOR

DR MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

Instituto Nacional de Medicina Genómica

DR JORGE GUSTAVO MORALES MONTOR

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Ciudad de México, a 15 de febrero del 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

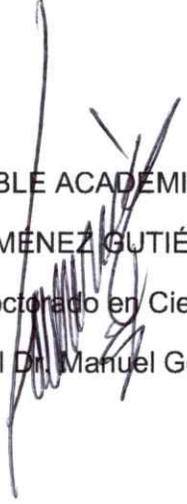
ALAN DE JESÚS MARTÍNEZ SALAS
SUSTENTANTE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS



TUTOR

DR FELIPE VADILLO ORTEGA

Instituto Nacional de Medicina Genómica



RESPONSABLE ACADEMICO

DR CARLOS JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

Programa Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas

Sede Hospital General Dr. Manuel Gea González

AGRADECIMIENTOS

A los alumnos de Maestría y Doctorado del Instituto Nacional de Medicina Genómica cuyo apoyo incondicional fue esencial en el desarrollo de los estudios moleculares y genómicos, Marian, Sergio y Miguel.

A la Dra. Sara Parraguirre Martínez, y a todos los integrantes de la División de Patología del Hospital Dr. Manuel Gea González por su apoyo indispensable en el presente estudio.

Al Dr. Carlos Pacheco Gahbler y al Departamento de Urología por su apoyo indispensable en el desarrollo del presente trabajo.

NOTA ACLARATORIA

Durante el año 2020 se realizó la reconversión hospitalaria ante la pandemia de la COVID-19, oficialmente anunciada por las autoridades de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, el 29 de marzo del 2020. La reconversión consistió de tres fases, en las que participaron seis hospitales, tanto de la Ciudad de México, como del Estado de México.

Derivado de lo anterior, el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, de la Secretaría de Salud fue reconvertido a Hospital COVID y es uno de los Hospitales Generales que hasta el día de hoy, sigue siendo parte de esta estrategia nacional. La dinámica interna que se vivió a partir de marzo del 2020, condujo al cierre inmediato de algunos servicios clínicos y al cierre total de las actividades académicas presenciales de pregrado y posgrado, con el consecuente impacto en la ausencia de la atención médica habitual y la paralización total de las dinámicas de investigación y enseñanza.

La emergencia sanitaria también afectó el funcionamiento del Instituto Nacional de Medicina Genómica, sitio en el que se desarrolla la fase experimental del proyecto del alumno de Maestría Alan de Jesús Martínez Salas y que estuvo cerrado durante casi un año. Por estas razones fue necesario implementar acciones dirigidas a continuar con un ritmo lento el desarrollo del proyecto, que incluyeron la captura de muestras biológicas, así como su procesamiento para los propósitos del proyecto. Estas condiciones retrasaron de forma considerable la fase de análisis de las muestras de tejido prostático.

Con el propósito de no cancelar el desarrollo del programa de estudios y la graduación oportuna de los alumnos del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas (PMDCMOS, UNAM), que coordina la Dra. María Teresa Fortoul Van der Goes y con la decisión colegiada del Subcomité Académico (SA), se instruyó a todos los responsables de las sedes del programa a facilitar el proceso de avance y conclusión de los estudios de los alumnos del posgrado. Para la adecuación del proceso de elaboración de la tesis del alumno Martínez Salas, se ajustaron las metas del estudio, en acuerdo del tutor académico y del responsable de la sede, sin que ello requiera aprobación por escrito del SA.

En el presente documento de tesis, la pregunta de investigación, los objetivos de estudio y la metodología no se modificaron con respecto al proyecto autorizado y se decidió reportar resultados preliminares, que incluyen la descripción demográfica y datos generales de los pacientes de los que fue posible obtener muestra biológica. Se describen también las características del seguimiento y desenlace clínico oncológico. Se incluyeron además los resultados de la extracción y análisis de calidad del DNA de todas las muestras, así como los resultados del diseño y estandarización de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) específica para el gen PBRM-1.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Epidemiología del cáncer de próstata.....	3
1.2 Biología molecular del cáncer de próstata.....	3
1.3 PBRM1 en cáncer de próstata.....	7
2. Planteamiento del problema.....	9
3. Objetivos.....	9
4.1 Objetivo general.....	9
4.2 Objetivos específicos.....	10
4. Hipótesis.....	10
5. Material y métodos.....	11
5.1 Reclutamiento de los pacientes.....	11
5.2 Registro de las variables.....	11
5.3 Diagnóstico histopatológico de cáncer de próstata.....	12
5.4 Seguimiento clínico y oncológico de los pacientes.....	12
5.5 Obtención de material de patología.....	14
5.6 Desparafinamiento y extracción de DNA.....	15
5.7 Análisis de calidad de DNA.....	15
5.8 Elaboración de los “primers” específicos para PBRM1 y secuenciación.....	15
5.9 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	16
5.10 Secuenciación del gen PBRM1.....	16
5.11 Análisis estadístico.....	16
6. Resultados.....	19
6.1 Inclusión de los pacientes con cáncer de próstata.....	19
6.2 Características demográficas y oncológicas.....	19
6.3 Seguimiento clínico y desenlace oncológico.....	22
6.4 Extracción de DNA y análisis de calidad.....	22
6.5 Elaboración de los “primers” específicos para el gen PBRM1.....	22
6.6 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	26
7. Discusión.....	27
8. Conclusiones.....	30
8. Bibliografía.....	31

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es una de las neoplasias más incidentes a nivel mundial, en México es el cáncer con mayor prevalencia y la primera causa de muerte por cáncer en México en hombres, acorde a las últimas estadísticas del 2020. El CaP ha sido estudiado molecularmente a profundidad, sin embargo, el gen Polibromo-1 (PBRM1) ha sido analizado en pocos estudios genómicos, con prevalencias variables entre ellos, que van desde menos del 1% hasta el 40%, encontrando múltiples mutaciones diferentes, sin embargo, en ningún estudio se ha estudiado ninguna asociación entre la presencia de mutaciones en el PBRM1 y el desenlace oncológico de los pacientes con cáncer de próstata. Realizamos un estudio retrospectivo de cohorte histórica, con el objetivo de estudiar molecularmente las muestras de patología de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata en busca de mutaciones en PBRM1 como un posible factor pronóstico de desenlace oncológico. Se incluyeron 26 pacientes con expediente clínico completo y disponibilidad de muestras de patología íntegras para extracción adecuada del DNA. Realizamos extracción de DNA de las muestras de parafina, con subsecuente amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuenciación. Utilizando una herramienta informática diseñamos nuevos primers específicos para exones del gen PBRM1, utilizando exones previamente descritos en la literatura como controles para determinar la eficacia de nuestros diseños. Los 26 pacientes incluidos hasta el momento son una muestra representativa de pacientes con CaP, incluimos pacientes de todos los Grupos de Gleason histopatológico, y de los Grupos de Riesgo de la Asociación europea de Urología (European Association of Urology-EAU), con promedio de seguimiento de más de 5 años. Derivado de las restricciones condicionadas por la pandemia de SARS-CoV-2 reportamos resultados y conclusiones preliminares.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) has one of the highest incidences worldwide, in Mexico it was the malignancy with the highest incidence in males, as well as the first cause of oncologic mortality in males in 2020. PCa has been genetically studied, however, the Polybrome-1 (PBRM1) gene has only been reported in few studies so far, with a variable prevalence, ranging from less than 1% up to 40%, with multiple different mutations, and yet, no study has ever reported any studied association between PBRM1 mutations and the oncologic outcome of PCa patients. We performed a retrospective cohort, with the purpose of performing molecular analysis of paraffin stored histopathology specimens diagnosed with PCa, searching for mutations in PBRM1 gene as a possible prognostic factor of unfavorable oncologic outcome. We reported 26 patients so far, with complete medical file data and available pathology samples for DNA analysis. We performed DNA extraction from paraffin embedded tissue, with subsequent Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification and sequencing. Using a software tool we designed new specific DNA primers for PBRM1 exons, with previously published primers as comparison for the quality of our designed primers. The included 26 patients are an adequate representative sample of PCa patients, since we have subjects from all distinct Gleason Grade Groups, and all European Association of Urology (EAU) Risk Stratification Groups, with an average follow-up of more than 5 years. Due to the restrictions provoked by the SARR-CoV-2 pandemic, we report preliminary results and conclusions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, acorde a las últimas estadísticas internacionales representa la segunda neoplasia más frecuente en hombres, con una incidencia en el 2020 de 14.1 millones de nuevos casos en todo el mundo (Gandaglia; 2021). Se considera el cáncer con mayor incidencia en 120 de los 185 países censados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro de ellos México; es la quinta causa de muerte a nivel mundial, y la primera causa de muerte en 48 de los 185 países de la OMS, igualmente, dentro de ellos, en México (Gandaglia; 2021).

1.2 Biología molecular del cáncer de próstata

Dentro de las múltiples alteraciones que se han encontrado en pacientes con cáncer de próstata se han identificado distintas mutaciones somáticas y modulaciones epigenéticas que se correlacionan con diferentes fases de la oncogénesis. Con los conocimientos generados con el proyecto genoma humano se han estudiado múltiples genes implicados en el cáncer de próstata. En términos generales la mayor parte de las alteraciones estudiadas hasta hace unos años involucran la activación de oncogenes o el silenciamiento de genes supresores del crecimiento tumoral (Schrecengost, 2013).

Desde la primera conceptualización de las características emblemáticas del cáncer, publicadas por Hanahan y Weinberg en el año 2000, se han hecho múltiples avances en la genómica oncológica, particularmente con el advenimiento de la epigenética, sabiendo que existen distintos complejos proteicos que regulan la expresión de genes e incluso regulan la reparación y remodelación del DNA (Fouad, 20017). Es ya evidente que existen alteraciones somáticas en genes que suponen una progresión hacia el cáncer, pero se han encontrado incluso otras que suponen protección contra el mismo. El estudio del “microambiente”, relacionado con la implicación de células estromales es un componente importante, ya que se ha comprobado que mutaciones propias de estas células, más que mutaciones en la

célula origen, son las que inician los cambios para la transición hacia metaplasia y posteriormente hacia neoplasia de las células propias del tejido tumoral (Fouad, 2017).

En la última década el estudio molecular del cáncer de próstata se ha centrado en el receptor de andrógenos, su conformación genómica, expresión proteica y todos los factores epigenéticos asociados a su expresión (Berger, 2011; Watson, 2015; Sumiyoshi, 2019; Kobayashi, 2013). Se sabe que el cáncer de próstata inicialmente es dependiente de la señalización generada por los distintos andrógenos, particularmente la dehidrotestosterona (DHT), en el receptor de andrógenos de la célula del epitelio ductal prostático, sin embargo, con la evolución natural de la enfermedad, se desarrollan distintos mecanismos de independencia a la señalización de los andrógenos, lo que se conoce como “resistencia a castración” (Watson, 2015; Sumiyoshi, 2019; Kobayashi 2013). Se han descrito mutaciones específicas y amplificaciones en el propio gen del receptor de andrógenos, sin embargo estas mutaciones no explican por sí solas el fenómeno de resistencia y se ha evidenciado heterogeneidad genética y epigenética, encontrando alteraciones de genes vecinos y coactivadores, tales como RB1, PTEN, SPOP, ERG, TMPRSS2 predominantemente, y en complejos proteicos de efecto epigenético en el propio gen del receptor de andrógenos y otros genes implicados en la vía de activación y expresión del mismo, lo cual supone una activación y expresión del receptor de andrógenos aún en ausencia de andrógenos (Watson, 2015; Sumiyoshi, 2019).

Se han estudiado múltiples mecanismos epigenéticos relacionados con oncogénesis en CaP. La metilación de histonas es un fenómeno que supone el “cierre” conformacional del DNA inactivando su transcripción, se sabe que en CaP existe hipermetilación de regiones específicas, tales como genes supresores de tumores (p16, p53, PTEN), en etapas avanzadas de CaP, tales como en resistencia a castración, incluso el gen del receptor de andrógenos se encuentra hipermetilado, lo cual en condiciones normales provocaría una disminución en la actividad transcripcional provocado por andrógenos, sin embargo, en estos casos se ha encontrado proteínas con actividad epigenética diversa (SUV39H1, KMT1A,

SEDTDB1, SMYD3) que suplen, e incluso tienen mayor actividad transcripcional dependiente de andrógenos, aún en ausencia de la expresión del receptor o disminución de esta hormona (Ruggero, 2018). La acetilación de histonas es el fenómeno contrario, supone un mecanismo de inicio o “estimulación” para la transcripción genética, en CaP existen regiones promotoras, particularmente relacionadas con el receptor de andrógenos, y con los mecanismos dependientes de la respuesta a estas hormonas (en caso de CaP resistente a castración), que se encuentran acetiladas, y por lo tanto promueven la transcripción de estas regiones (Ruggero, 2018) Existen complejos proteicos, tal como el “Polycomb repressive complex 2” (PRC2), que realiza cambios epigenéticos mediante la metilación de histonas de heterocromatina de regiones del DNA que se correlacionan con el gen del receptor de andrógenos, en donde se ha encontrado alteraciones en una subunidad enzimática llamada EZH2 (Enhancer of zeta homolog 2) esta subunidad cumple las funciones catalíticas del complejo, observándose que alteraciones en el gen EZH2 transforman el PRC2 en un coactivador de la expresión del receptor de andrógenos, y de la transcripción genética mediada por el mismo (Xu K, 2012). Existen proteínas que generan actividad transcripcional en zonas acetiladas del DNA, que bien pueden actuar por sí solas, formando complejos entre ellas mismas, o como subunidades enzimáticas de complejos proteicos más grandes, conocidas como “proteínas contenedoras de bromodominios” (BRD, por sus siglas en inglés). Existen 42 diferentes BRDs, las más relevantes son BRD2, 3 y 4 y hasta en el 50% de los CaP se han encontrado mutaciones diversas en éstas (Ruggero, 2018). Existen complejos proteicos denominados “complejos remodeladores de histonas”, uno de gran interés de estudio desde hace casi dos décadas se conoce como SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable). Este complejo fue estudiado inicialmente en levaduras en 1994, encontrando su papel regulador en hasta un tercio del genoma completo de las mismas, posteriormente en la Drosophila y en año 2000 se estudió su papel en mamíferos (Reisman, 2009). En la actualidad se sabe que el 20% de la actividad tumoral en humanos está regulada o presenta algún tipo de alteración en uno o más de los componentes del Complejo SWI/SNF. Este complejo es expresado en todos los tejidos, y se compone de dos variantes o

unidades diferentes, según los distintos componentes proteicos, la primera conocida como BAF, compuesta de dos unidades únicas para ese complejo, ARID1A y ARID1B y otro, presente específicamente en algunos tejidos de interés, tales como riñón y próstata, llamada PBAF (Polybromo-associated BRG1 factor), cuyos componentes únicos son el ARID2 y el Polibromo-1 (PBRM1), una proteína compuesta por varias BRDs (Xu K, 2012; Reisman, 2009; Biegel 2014; Wilson, 2011; De Costa, 2014). El complejo remodelador SWI/SNF actúa mediante ATPasas, sobre dominios en histonas (particularmente H3) mediante acetilación, carboxilación, ubiquitinación y fosforilación, en zonas condensadas del DNA en forma de heterocromatina; su acción principal consiste en remover o reemplazar octámeros de histonas del nucleosoma, permitiendo la expresión de genes necesarios para el adecuado funcionamiento del ciclo celular (Biegel, 2014; Wilson, 2011; De Costa, 2014; Varela, 2011; Thompson, 2009).

Respecto al receptor de andrógenos, se ha visto en estudios experimentales que el Complejo SWI/SNF tiene un efecto activador o estimulador sobre genes que tienen una acción directa en la expresión para la formación de proteínas que son componentes de receptores hormonales, adicionalmente los distintos componentes del complejo SWI/SNF tienen la capacidad de interactuar directamente sobre proteínas de estos receptores, particularmente los de glucocorticoides, de estrógenos y de andrógenos (Thompson, 2009; Samowska, 2016; Jeong, 2009).

La proteína Polibromo 1 (PBRM-1) es codificada por un gen con el mismo nombre, localizado en el cromosoma 3p21.1, compuesto de 37 exones, con una longitud de 140,499 pares de bases, localizado entre los pares de bases 52545352 y 52685917, que codifica para una proteína con el mismo nombre, de 1689 aminoácidos, también conocida como BAF180 (BRG-associated factor 180) (Jeong, 2009; Porter, 2017; Horikawa, 2002; OMIM, 2018; Gene, 2018; UniProt, 2018; Ensemble Project, 2018; Slaughter, 2018). El gen PBRM-1 se ha estudiado relativamente poco en comparación con otros genes en el campo de la oncología, se compone de 6 distintas regiones codificantes para BRDs, en donde se conocen ya múltiples

mutaciones bien localizadas, particularmente de cambio de sentido, estudiadas en el carcinoma de células claras renal (Slaughter, 2018; Piva, 2015).

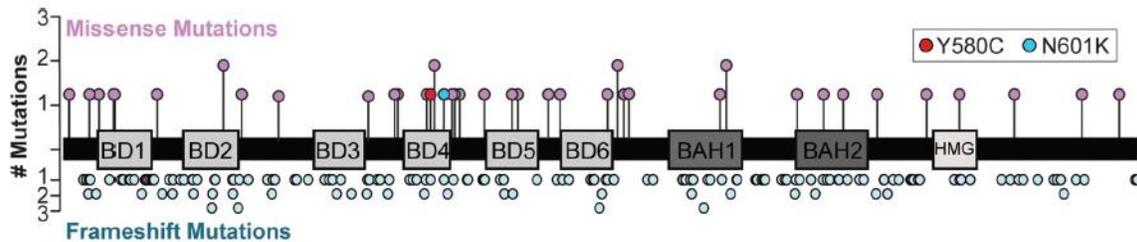


Figura 1. Estructura del Gen PBRM1 y sus mutaciones

Mediante estudios de inmunohistoquímica y anticuerpos dirigidos hacia la proteína Polibromo 1, así como estudios de RNA para analizar la expresión del gen PBRM1 se ha visto que este gen tiene actividad y expresión en todos los tejidos; la principal utilidad actual del estudio del gen PBRM-1 radica en el cáncer de células renales, donde se ha encontrado una asociación entre mutaciones en dicho gen en pacientes con cáncer renal de células claras, considerándose el segundo gen mutado más frecuente, hasta en el 40% (Ensemble Project, 2018; Slaughter, 2018; Piva, 2015; Brugarolas, 2013). Se ha estudiado en modelos experimentales, utilizando células que han sido alteradas genéticamente para eliminar o silenciar el gen PBRM-1, encontrando que al reintroducir el gen, mediante su expresión se logra apoptosis o bien detención completa del ciclo celular, concluyéndose su participación como un gen que suprime la replicación no controlada de células tumorales (Varela, 2011; Porter, 2017; Brugarolas, 2013).

1.3 PBRM-1 en cáncer de próstata

El análisis relacionado con el PBRM1 ha sido en su mayoría en estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Studies-GWAS*) o se secuenciación masiva de exoma, con tejidos tumorales almacenados en bancos de tejidos, con el fin de encontrar asociaciones en miles de genes, en la mayoría de los casos los hallazgos encontrados en el PBRM1 han sido resultados secundarios no buscados intencionadamente. El primer estudio en la literatura que reporta el

hallazgo de mutaciones en PBRM1 en cáncer de próstata fue publicado en el año 2011 por Berger y cols (2011), mediante un análisis de secuenciación masiva realizado en muestras de tejido prostático tumoral de 7 pacientes, todos ellos con Gleason mayor a 7, encontraron 3,866 mutaciones somáticas distintas, entre ellas mutaciones de cambio de sentido en PBRM1 en 3 de los 7 pacientes, con una prevalencia de 42.7%, debido a la naturaleza descriptiva del estudio no se buscó ninguna asociación con desenlace o pronóstico (Berger, 2011). Posteriormente en el 2012, Barbieri y cols (2012) realizaron un análisis de secuenciación masiva del exoma de 112 pacientes con cáncer de próstata (muestras histopatológicas almacenadas), encontrando 5,764 mutaciones somáticas distintas presentes en tejido tumoral, pero ausentes en tejido sano y en sangre periférica, dos de los 112 pacientes presentaron mutaciones de nucleótido simple y delección de codón en PBRM1, con una prevalencia del 1.8%, sin reportar asociación con desenlace, pronóstico o supervivencia (Barbieri, 2012). En el 2012 Grasso y cols (2012) secuenciaron el exoma de 50 pacientes con cáncer de próstata, cuyo tejido fue obtenido de autopsias, para identificar mutaciones somáticas, encontrando 1 paciente (prevalencia de 2%) con mutación de nucleótido simple con pérdida de sentido, si bien, no realizaron ningún análisis estadístico de supervivencia, en las tablas demográficas de los pacientes se encontró que el paciente con mutación en PBRM1 presentó un Gleason 10, con un antígeno prostático específico de 2,000ng/ml y reportaron que el paciente había fallecido 37 meses después al diagnóstico de cáncer de próstata (Grasso, 2012). Nickerson y cols (2013) publicaron en 2013 otro análisis de secuenciación masiva de 5 pacientes con CaP, encontrando 1 paciente (20%) con mutación en PBRM1, el cual presentaba características oncológicas desfavorables, siendo metastásico al diagnóstico y con un Gleason 10 (Nickerson, 2013). En el año 2015, el *Cancer Genome Atlas Research Network (2015)*, un departamento dependiente del *National Institute of Health (NIH)* de Estados Unidos, realizó un gran estudio de asociación de genoma completo de 333 muestras de tejido tumoral de CaP, dentro de las variables mutaciones que encontraron en miles de genes, encontraron dos pacientes (0.6%) con mutaciones diversas en PBRM1, predominantemente de cambio de sentido,

ambas en pacientes con Gleason mayor a 7, de igual manera, no se realizó ningún estudio de supervivencia o pronóstico en los pacientes estudiados (Cancer Genome Atlas, 2015). En el año 2017 se publicó una revisión de la literatura por Hopson y Thompson (2018), concluyendo una prevalencia de mutaciones en PBRM1 en pacientes con CaP de hasta el 7%, basándose en la literatura previamente publicada (Hopson, 2018). En el año 2018 Urbanucci y Mills (2018) publicaron un artículo reportando la frecuencia y subtipos de mutaciones en proteínas contenedoras de bromodominios en cáncer de próstata, reportando una frecuencia de hasta 30% de mutaciones en PBRM1 en CaP resistente a castración (Urbanucci, 2018). Finalmente en el 2019, Mota y cols, basándose en la literatura conocida, realizaron un análisis del mRNA de PBRM1 en tejido prostático y en cultivos celulares modificados con el fin de estudiar la expresión del gen PBRM1 en cáncer de próstata, encontrando que el mRNA de PBRM1 se expresaba hasta 9 veces más en cáncer de próstata con características oncológicas desfavorables, en pacientes con Gleason mayor a 8 y en pacientes con resistencia a castración, de igual manera encontraron que existían variantes en el mRNA y en la proteína PBRM1 en estos pacientes, concluyendo tanto la presencia de cambios en la secuencia del gen PBRM1 como cambios postraduccionales de la proteína en estos pacientes (Mota, 2019). Tomando en cuenta los distintos estudios mencionados, el promedio de mutaciones en PBRM1 en pacientes con CaP reportado en la literatura es de 14% (mínima 0.6 y máxima 42%), variable entre las poblaciones estudiadas, sin embargo es evidente que se encuentra predominantemente asociada a factores de mal pronóstico, particularmente Gleason elevado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de estudios transversales y de asociación genética demostrando la presencia de mutaciones en el gen PBRM1, presentes en pacientes con cáncer de próstata con características histopatológicas y clínicas desfavorables, tales como un Gleason elevado o bien metastásicos, sin embargo, no se ha realizado ningún estudio analítico relacionado con la supervivencia, recurrencia y progresión de la enfermedad en estos pacientes. La realización de un estudio longitudinal, con el

objetivo de analizar la supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata con mutaciones en PBRM1 supone la obtención de información nunca estudiada y la posibilidad de establecer el análisis de mutaciones en el gen PBRM1 como un factor pronóstico de utilidad clínica en cáncer de próstata.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar las mutaciones en el gen PBRM1 como un factor de pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de próstata a 5 años de seguimiento.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar la prevalencia de mutaciones en el gen PBRM1 en pacientes con cáncer de próstata.
2. Asociar las mutaciones en el gen PBRM1 en pacientes con cáncer de próstata con los hallazgos histopatológicos desfavorables en la biopsia prostática transrectal (BPTR)
3. Asociar las mutaciones en el gen PBRM1 en pacientes con cáncer de próstata con los estadios de riesgo establecidos por la *European Association of Urology (EAU)*
4. Correlacionar las mutaciones en el gen PBRM1 con el antígeno prostático específico (APE).
5. Analizar la supervivencia global a 2 y 5 años en pacientes con mutaciones en PBRM1
6. Analizar la supervivencia libre de progresión bioquímica a 2 y 5 en pacientes con mutaciones en PBRM1
7. Analizar la supervivencia libre de progresión a 2 y 5 en pacientes con mutaciones en PBRM1

4. HIPÓTESIS.

- 1 El score de Gleason de las BPTR de los pacientes con mutaciones en el gen PBRM1 será mayor en los pacientes con mutaciones en el gen PBRM1 en comparación con los pacientes sin mutaciones.
- 2 Los pacientes con mutaciones en PBRM1 presentarán un estadio de peor riesgo EAU que aquellos sin mutaciones.
- 3 La presencia de mutaciones en PBRM1 se correlacionará con concentraciones mayores de APE al momento del diagnóstico, en comparación con aquellos sin mutaciones.
- 4 La supervivencia libre de recurrencia bioquímica y progresión de la enfermedad será menor en los pacientes con mutaciones en PBRM1 en comparación con los pacientes sin mutaciones.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Reclutamiento de los pacientes

Se utilizó la base epidemiológica del Departamento de Urología del Hospital Dr. Manuel Gea González, estandarizada y disponible a partir del año 2009, se buscaron los registros clínicos (expedientes clínicos) y sus correspondientes muestras de patología (tejido prostático), de pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata. Se incluyeron todos aquellos pacientes masculinos, entre 50 y 90 años, con diagnóstico confirmado histopatológicamente de cáncer de próstata, mediante biopsias prostáticas transrectales o la pieza quirúrgica resultado de prostatectomía radical, que contaran con expediente clínico completo, con seguimiento mínimo de 2 años y cuyos bloques de parafina se encontraran físicamente disponibles en el Departamento de Patología, para su análisis molecular. Los tejidos emparafinados se obtuvieron de pacientes vistos entre el 01 de enero del 2009 al 30 de diciembre del 2015.

5.2 Registro de las variables

Los datos clínicos de los pacientes registrados al momento del diagnóstico de cáncer de próstata incluyeron la edad, comorbilidades, y tabaquismo activo; los

datos clínicos oncológicos al diagnóstico incluyeron antígeno prostático específico (APE), medido en nanogramos por mililitro (ng/mL), tacto rectal, definido como sospechoso o no, el grupo de riesgo acorde a la Asociación Europea de Urología (European Association of Urology-EAU, 2021), dividido en tres grupos, bajo, intermedio y alto riesgo, descritos en la Tabla 1. Aquellos pacientes con APE al diagnóstico mayor a 10 ng/mL, se registraron los estudios adicionales para evidenciar presencia o ausencia de metástasis óseas o viscerales, con lo cual se diagnosticó o descartó CaP metastásico al momento del diagnóstico.

Estratificación de Riesgo de la European Association of Urology (EAU)³⁴			
Bajo riesgo	Riesgo Intermedio	Alto riesgo	
APE <10 ng/ml	APE 10-20 ng/ml	APE >20 ng/ml	Cualquier APE
Gleason <7	Gleason <7	Gleason >7	Cualquier Gleason
cT1-2 ^a	cT2b	cT2c	cT3-4 o N+
Localizado			Localmente avanzado

Tabla 1. Estratificación de riesgo acorde a las guías del 2020 para Cáncer de Próstata de la “European Association of Urology” (EAU).

5.3 Diagnóstico histopatológico de cáncer de próstata

Se registró el resultado histopatológico de las biopsias prostáticas transrectales guiadas por ultrasonido, de cada paciente, de acuerdo a la escala de Gleason; con base en esta misma escala, se asignó a cada paciente uno de los 5 grupos establecidos por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (International Society of Urological Pathology-ISUP, 2014) descritos la Figura 3. De igual manera se registró la presencia o ausencia de invasión linfovascular. Con el diagnóstico histopatológico de cáncer de próstata se registró la estadificación TNM clínica y patológica de cada paciente.

“International Society of Urological Pathology” (ISUP)³⁵
ISUP 1= Gleason 3+3=6
ISUP 2= Gleason 3+4=7
ISUP 3= Gleason 4+3=7
ISUP 4= Gleason 4+4=8 o Gleason 3+5=8 o Gleason 5+3=8
ISUP 5= Gleason 4+5 ó 5+4 = 9 o Gleason 5+5=10

Tabla 2. Grupos histopatológicos acorde a la International Society of Urological Pathology, publicados en las guías del 2020 de Cáncer de Próstata de la “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN).

5.4 Seguimiento clínico y oncológico de los pacientes

Se registró el seguimiento de la evolución de los pacientes por 5 años. Todos los pacientes reciben seguimiento trimestral posterior al manejo indicado para el cáncer de próstata, prostatectomía radical o radioterapia en caso de cáncer de próstata no metastásico, acorde al grupo de riesgo EAU de cada paciente, y terapia de privación androgénica (en el caso de nuestro hospital, con análogos de hormona liberadora de gonadotropina u orquiectomía radical), en caso de pacientes metastásicos al diagnóstico; independientemente del manejo indicado, el seguimiento en el hospital es trimestral, con mediciones de APE trimestrales, el cual se registró en todos los casos. Se registró la recurrencia bioquímica, definida como cualquier elevación de APE mayor a 0.2 ng/mL en pacientes manejados con prostatectomía radical, o bien mayor a 2.0 ng/mL en los pacientes manejados con radioterapia, así como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la aparición de recurrencia bioquímica; de igual manera se registró la progresión de la enfermedad, definida como la aparición de metástasis ganglionares, óseas, o viscerales en pacientes no metastásicos al momento del diagnóstico, y de lesiones adicionales o nuevas no presentes al momento del diagnóstico en caso de pacientes metastásicos al diagnóstico; para el análisis de la presencia de metástasis se utiliza el gammagrama óseo en aquellos pacientes con APE mayor a 10 ng/mL y la tomografía por emisión de positrones (PET-CT, por sus siglas en inglés), en

aquellos casos con antígeno mayor a 2 ng/ml pero menor a 10 ng/mL, en ambos estudios se definió como positiva para metástasis cualquier lesión concluyente como tal por el radiólogo especialista que dictaminó el reporte. Se registró el tiempo transcurrido entre el tratamiento indicado para CaP y la aparición de progresión de la enfermedad. Por último, en pacientes sometidos a tratamiento con bloqueo hormonal se definió la resistencia a castración, término únicamente existente en cáncer de próstata, que se define como la presencia de actividad tumoral prostática a pesar de terapia de deprivación androgénica, la cual se evidencia con la elevación de antígeno prostático específico por encima de 2.0 ng/ml en tres mediciones consecutivas en el contexto de tratamiento con deprivación androgénica, con niveles serológicos de testosterona menores a 0.50 ng/dl.

5.5 Obtención de material de patología

Todas las muestras de biopsias transrectales prostáticas analizadas por el Departamento de Patología son fijadas en formalina y almacenadas en bloques de parafina para su resguardo. Previa solicitud formal y autorización por parte del Comité de Ética e Investigación y la Jefatura del Departamento de Patología del Hospital Dr. Manuel Gea González, se hizo petición para el aporte de las muestras de parafina de los pacientes por parte del personal del Departamento de Patología. De las muestras disponibles de parafina de cada sujeto, se realizaron múltiples cortes de 10 micrómetros de muestra para su subsecuente desparafinamiento y extracción de DNA.

5.6 Desparafinamiento y extracción del DNA

Los cortes micrométricos de los bloques de parafina de cada sujeto fueron sometidos al proceso de desparafinamiento, descrito a continuación.

Para cada muestra de biopsia prostática transrectal entregada por el Departamento de Patología, se retiró el exceso de parafina y el tejido se desprendió por raspado directo y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se agregaron 800 μ L de Xilol a cada tubo, posteriormente se agitó con vórtex por 20 segundos y se centrifugaron a

temperatura ambiente, a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) por 2 minutos y se retiro el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol al 90% a cada muestra, se agitaron con vórtex por 20 segundos y nuevamente se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 minutos, extrayendo el sobrenadante después de centrifugar. Se añadieron 220 μ L de buffer ATL (Animal Tissue Lysis), para lisis tisular, y 25 μ L de Proteinasa K, dejándose incubar en termociclador a 56°C por 18 horas. Posteriormente se aumenta la temperatura del termociclador a 90°C y se incuba por 1 hora, se extraen los tubos y se centrifugan por 10 segundos. Se extrae la fase clara del producto y se coloca en un tubo limpio de 1.5 ml. Se agregan 200 μ L de buffer AL, mezclando con vortex, se agrega posteriormente 200 μ L de etanol al 100%, nuevamente mezclando la solución. Se centrifuga por 10 segundos. El contenido completo se transfiere cuidadosamente a un tubo con columna "MinElute" del kit QIAmp de 2mL y se centrifuga a 11,000 rpm por 1 minuto. Posterior a la centrifugación, se separa la columna y se coloca en nuevo tubo de 2mL, desechando el tubo previo de 2mL con el líquido contenido. Se añaden 500uL de buffer AW1 a la columna MinElute, nuevamente centrifugando a 11,000 rpm por 1 minuto, se extrae y coloca en otro tubo de 2 mL y se desecha el tubo previo. Se agregan 500 μ L de buffer AW2, se repite centrifugación con mismos parámetros y retiro y recolocación en tubo limpio de 2mL. Se centrifuga nuevamente, a 13,000 rpm por 3 minutos. Se retira columna "MinElute" y se coloca en tubo de 1.5 mL desechando tubo previo. Se agregan 25 uL de buffer ATE directamente en la membrana sin tocarla, se centrifuga a 13,000 rpm por 1 minuto. Se retira columna "MinElute" y se conserva tubo de 1.5 mL con DNA extraído en solución, almacenándolo a -20°C.

5.7 Análisis de calidad de DNA

Una vez obtenido el DNA, se realizó espectrometría para determinar la cantidad y calidad del DNA extraído de cada muestra, utilizando el equipo NanoDrop™ one Microvolumen UV-Vis (Thermo Fisher Scientific), se registraron los resultados de absorbancia de cada muestra de DNA analizada. Se determinó la absorbancia a 260 nm, con el fin de obtener la concentración de DNA en ng/ μ L. Asimismo se determinaron los coeficientes 260/280 y 260/230 los cuales indican la pureza de la

muestra, tomando como referencia un valor aproximado de 2.0 en el coeficiente 260/280 y un valor 1.8 a 2.2 en el cociente 260/230.

5.8 Elaboración de los “primers” específicos para PBRM1 y secuenciación

Con base en la información conocida de la secuencia de PBRM1, utilizando las herramientas de NCBI, Gene y Genome Data Viewer, y la herramienta cBioPortal (cbioportal.org) se prepararon las bibliotecas de los primers específicos para el gen PBRM1 para secuenciación.

5.9 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Se realizó la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el sistema Applied Biosystems QuantStudio™ PCR System, mediante el método curva estándar y 45 ciclos. Se preparó un gel para electroforesis, con 0.75 gramos de agarosa UltraPure™ ThermoFisher Scientific, los cuales se disolvieron en 50 mL de buffer TBE 0.5x. Posterior a la polimerización del gel se cargaron 200 ng de DNA, 2 µL de buffer de carga y 2 µL de Gel Red 1x. La electroforesis se realizó a 75 V durante 1 hora. Tras la electroforesis se reveló la integridad del DNA mediante el sistema transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System.

5.10 Secuenciación del gen PBRM1

Usando máster mix con polimerasa Taq y reactivos AmpliSeq Illumina para el estudio de secuenciación utilizamos un equipo MiSeq para la secuenciación de los amplicones. Utilizamos al menos tres métodos bioinformáticos por convergencia para estimar la presencia de las mutaciones somáticas. Se registraron cada una de las mutaciones obtenidas en la secuenciación del gen PBRM1 para cada uno de los pacientes.

5.11 Análisis estadístico

Para reportar las características demográficas y resultados generales y específicos de la población estudiada, como medida de tendencia central se utilizó la media y

mediana (en caso de curtosis y asimetría evidente) en conjunto con su correspondiente medida de dispersión, desviación estándar (en caso de obtener una desviación estándar -DE- mayor a 50% del valor de la media se utilizará el error estándar de la media -EE-) y rango intercuartil (RI) respectivamente, para las variables cualitativas continuas y discontinuas.

Las características demográficas y resultados generales y específicos de las variables cualitativas se reportaron en frecuencias absolutas y relativas.

Se reportaron los datos demográficos y resultados en la población total, así como por cada grupo de la cohorte (con mutaciones en PBRM1 y sin mutaciones en PBRM1), de igual manera hizo análisis de subgrupos acorde a al ISUP y la estadificación de riesgo de la EAU, reportando los datos demográficos y resultados generales para cada grupo de ISUP y de riesgo. De igual manera en el grupo con mutaciones en PBRM1 se estratificó a los pacientes acorde al acúmulo de mutaciones diferentes en el mismo gen obteniendo distintos grupos según el número de mutaciones.

Se utilizaron distintos estadísticos para el análisis inferencial según las características de la variable analizada.

Para el análisis de la distribución de las variables cualitativas nominales y ordinales de manera aislada, así como para analizar la asociación de independencia entre distintas variables cualitativas, se utilizó la prueba de Chi (χ^2) cuadrada y el estadístico exacto de Fisher según las categorías de las distribuciones observadas.

Previo análisis inferencial de las variables cuantitativas se realizó pruebas de curtosis y asimetría para determinar dichas características en las variables estudiadas (coeficiente de Fisher-Pearson de asimetría y curtosis).

Para el análisis de la varianza de una variable cualitativa (en una muestra -un grupo- o bien en dos o más muestras independientes -dos o más grupos-) se utilizó el estadístico T de Student para dos muestras o análisis de varianza (ANOVA) en caso más de dos muestras (grupos) si se asume normalidad, en caso contrario se utilizó

el estadístico de U de Mann-Whitney (dos grupos) o Kruskal Wallis (más de dos grupos).

Para las mediciones repetidas de las distintas variables cualitativas en el seguimiento de la población se realizó análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) si se asume normalidad, en caso contrario, la prueba de Kruskal Wallis.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para inferir la asociación lineal entre las variables cualitativas ordinales que suponen las estadificaciones por grupos (grupos de ISUP y riesgo EAU) así como acorde al acúmulo de mutaciones, con las distintas mediciones de APE (al diagnóstico, y cada 3 meses), así como el tiempo (en meses) del seguimiento previo a la recurrencia bioquímica, progresión de la enfermedad y muerte.

5.11.1 Análisis de supervivencia y valor pronóstico

Para el análisis de supervivencia a 2 y 5 años, se utilizó un análisis de regresión logística simple para todas las variables asociándolas con el tiempo de seguimiento o evolución previo a la aparición de cada uno de los eventos de desenlace de supervivencia estudiados (recurrencia bioquímica, progresión de la enfermedad y mortalidad), posteriormente se realizó un análisis de regresión logística múltiple de todas las variables juntas (Edad estratificada por rangos, grupo de cohorte, ISUP, riesgo EAU, acúmulo de mutaciones, nivel de APE inicial estratificada por rangos y TNM) con el tiempo de seguimiento o evolución previo a la aparición de cada uno de los eventos de desenlace de supervivencia estudiados (recurrencia bioquímica, progresión de la enfermedad y mortalidad), estimando el efecto en la probabilidad de supervivencia al evento estudiado (Razón de Riesgo o *Hazard Ratio-HR*). Se utilizará el estadístico y gráficos de Kaplan-Meyer, con posterior, análisis de rangos logarítmicos de Mantel-Cox y prueba de Mantel-Cox para estimación de la Razón de Riesgo (*Hazard Ratio-HR*) de supervivencia (supervivencia libre de recurrencia bioquímica, supervivencia libre de progresión de la enfermedad y supervivencia global) entre los dos grupos de la cohorte, según el acúmulo de mutaciones en PBRM1, y entre los distintos subgrupos de ISUP y de riesgo EAU.

Se tomó un nivel de significancia del 95% ($p=0.05$) para todas las pruebas estadísticas.

6. RESULTADOS

6.1 Inclusión de los pacientes con cáncer de próstata

Tras la revisión de la base de datos epidemiológica del Departamento de Urología se obtuvo un registro de 405 pacientes con cáncer de próstata entre el 01 de enero del 2009 al 31 de diciembre del 2015. Posterior a la autorización del Comité de Ética e Investigación del Hospital, se pudo obtener acceso al registro de las muestras de parafina disponibles físicamente en el almacén del Departamento de Patología. Tras la revisión de la disponibilidad física de los bloques de parafina por parte del personal del Departamento de Patología, se pudieron incluir hasta la redacción de la presente Tesis, 26 sujetos con bloques de parafina disponibles y con su correspondiente expediente clínico completo.

6.2 Características demográficas y oncológicas

De los 26 pacientes incluidos hasta el momento, la edad promedio al momento del diagnóstico de cáncer de próstata fue 71.6 ± 7.1 años (promedio \pm desviación estándar). Todos los pacientes fueron diagnosticados mediante biopsias prostáticas transrectales guiadas por ultrasonido (BTRUS por sus siglas en inglés), acorde al esquema estandarizado de 12 biopsias por sextantes. Del total de pacientes 10 (38.5%) fueron diagnosticados secundario a tamizaje o detección oportuna de cáncer de próstata, 16 (61.5%) pacientes se presentaron por sintomatología urinaria baja obstructiva. Veintidós (84.6%) de los pacientes presentaron a la exploración física inicial un tacto rectal sospechoso, 4 (15.4%) no presentaron tacto rectal sospechoso. El antígeno prostático específico (APE) promedio inicial fue de 27.01 ± 31.28 ng/mL (promedio \pm DE). Cinco pacientes (19.2%) presentaron un APE inicial menor a 10 ng/mL, 21 (80.8%) un APE inicial mayor o igual a 10 ng/mL.

De los resultados de las BTRUS, 11 (42.3%) pacientes presentaron Gleason Grupo 1 (G1) 3+3=6, 2 (7.7%) pacientes Gleason Grupo 2 (G2) 3+4=7, 2 (7.7%) pacientes Gleason Grupo 3 (G3) 4+3=7, 6 (23.1%) Gleason Grupo 4 (G4) 4+4=8, y 4 (15.4%)

Gleason Grupo 5 (G5), 4+5 o 5+4=9 o 5+5=10. Catorce (53.8%) presentaron 5 o menos muestras (de las 12 biopsias) con cáncer de próstata, 12 (46.2%) presentaron 6 o más muestras con cáncer de próstata.

Tres pacientes (11.5%) presentaron evidencia de metástasis óseas al diagnóstico, siendo estadificados como M1b desde el diagnóstico. De los restantes 23 pacientes no metastásicos al diagnóstico, 3 (11.5%) pacientes fueron clasificados, acorde a la estratificación de riesgo EAU descrita en antecedentes, como riesgo Bajo, 7 (26.9%) como riesgo Intermedio, y 13 (50%) como riesgo Alto.

Quince (57.7%) pacientes fueron manejados con tratamiento radical, 13 (50%) pacientes fueron manejados con prostatectomía radical abierta y 2 (7.7%) pacientes con radioterapia radical, 8 (30.8%) pacientes fueron manejados con bloqueo hormonal como único tratamiento (sin radioterapia adicional), 7 (26.9%) con bloqueo hormonal con análogos de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) y 1 (3.8%) con orquiectomía simple bilateral, los restantes 3 (11.5%) pacientes fueron manejados con vigilancia (seguimiento clínico trimestral, sin recibir tratamiento curativo o bloqueo hormonal).

De los pacientes sometidos a prostatectomía radical (PR), 5 (19.2%) presentaron márgenes positivos a malignidad y 3 (11.5%) presentaron invasión linfovascular. De los pacientes con PR, 6 (%) presentaron un reporte histopatológico en la pieza quirúrgica de la PR con Gleason superior al reportado inicialmente en la BTRUS. La Tabla 3 ilustra las características oncológicas de los pacientes.

Variable		n(%) Total= 26 pacientes
Diagnóstico	Tamizaje	10 (38.5%)
	Sintomatología	16 (61.5%)
Tacto rectal	Sospechoso	22 (84.6%)
	No sospechoso	4 (15.4%)
APE inicial	Menor a 10 ng/mL	5 (19.2%)
	Mayor a 10ng/mL	21 (80.8%)
Gleason (Grupo ISUP) ³⁵	Gleason G1	11 (42.3%)
	Gleason G2	2 (7.7%)
	Gleason G3	2 (7.7%)
	Gleason G4	6 (23.1%)
	Gleason G5	4 (15.4%)
Muestras positivas a CaP	5 o menos	14 (53.8%)
	Más de 5	12 (46.2%)
Clasificación de riesgo al diagnóstico (EAU) ³⁴	Riesgo Bajo	3 (11.5%)
	Riesgo Intermedio	7 (26.9%)
	Riesgo Alto	13 (50%)
	Metastásico	3 (11.5%)
Tratamiento inicial	Prostatectomía radical	13 (50%)
	Radioterapia	2 (7.7%)
	Bloqueo hormonal	8 (30.8%)
	Vigilancia	3 (11.5%)

Tabla 3. Características oncológicas de los pacientes.

6.3 Seguimiento clínico y desenlace oncológico

El promedio de seguimiento clínico de los 26 pacientes fue de 5.2 ± 2.9 años (promedio \pm DE), el mínimo de seguimiento fue de 2 años y el máximo de 11 años.

De los pacientes manejados con PR, 2 (%) presentaron recurrencia bioquímica, sin progresión de la enfermedad a los 2 años de seguimiento; 2 (%) presentaron recurrencia bioquímica a los 5 años de seguimiento, uno (%) de ellos con actividad ósea metastásica y valor de APE en 144 ng/mL; 2 (%) pacientes presentaron recurrencia bioquímica, uno (%) con actividad metastásica ósea, a los 10 años de seguimiento.

Seis (23.1%) pacientes fallecieron durante su seguimiento, en 2 (7.7%) casos los pacientes presentaban elevación de APE mayor a 10 ng/mL y diagnóstico de recurrencia bioquímica y actividad tumoral en los datos de última consulta, los restantes 4 (15.4%) presentaban valores de APE por debajo de 1.0 ng/mL y sin evidencia de actividad tumoral o progresión de la enfermedad.

6.4 Extracción de DNA y análisis de calidad

Se realizó la extracción del DNA siguiendo la técnica previamente descrita, para las muestras de biopsias prostáticas de los 26 pacientes incluidos en el estudio, se realizó espectrofotometría por absorbancia para determinar la calidad del DNA obtenido de la parafina de cada paciente.

6.5 Elaboración de los “primers” específicos para el gen PBRM-1

Utilizando la herramienta bioinformática cBioPortal (cbioportal.org), se buscaron mutaciones reportadas en el gen del PBRM1. Se establecieron las variantes más frecuentes en distintas cohortes y estudios de secuenciación, reportados en el TGCA para cáncer de próstata, así como las mutaciones con relevancia clínica más frecuentes para dicha neoplasia.

Se identificaron 20 estudios reportados con mutaciones presentes en cáncer de próstata, en un total de 6334 muestras diferentes para 6048 pacientes diferentes,

con presencia de 1% (77 pacientes) con mutaciones en PBRM1, encontrando 55 mutaciones diferentes, representadas en la Figura 2.

MUTACIONES CLÍNICAMENTE RELEVANTES

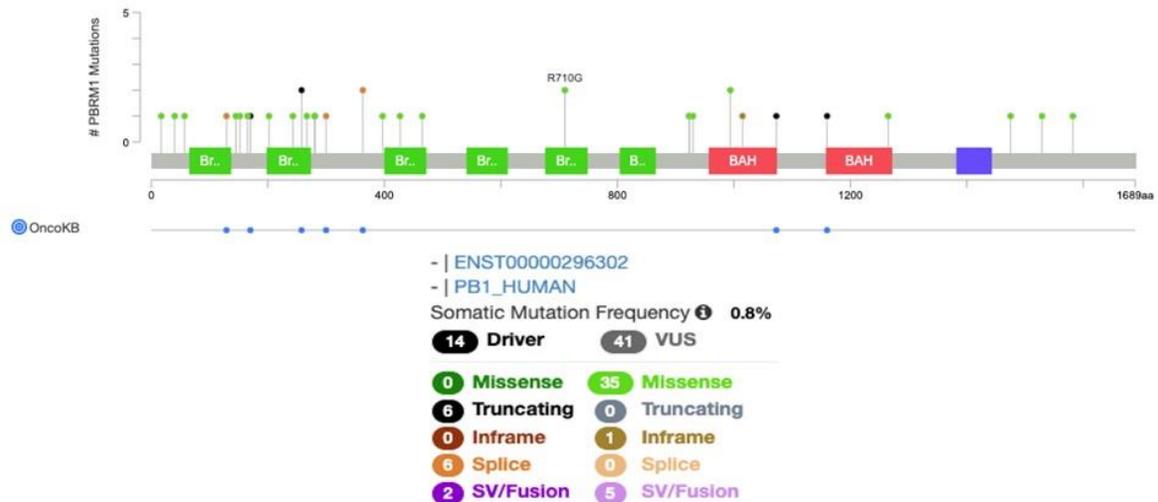


Figura 2. Utilizando herramienta cBioPortal se muestra la estructura del PBRM1, con la visualización de las mutaciones para CaP y su correspondiente localización en el gen

Dentro de las diferentes mutaciones, se encontraron 19 diferentes mutaciones clínicamente relevantes, y se identificaron 5 exones que contienen el mayor número de mutaciones clínicamente relevantes, los exones 4, 7, 8, 20 y 22. Las Figuras 3^a y 3^b ilustran las mutaciones clínicamente relevantes reportadas previamente, y sus características y exón de localización.

MUTACIONES CLÍNICAMENTE RELEVANTES

Prostate Canc...	ICGC_FC...	Prostate	Q170*	●	Nonsense		2	3	52696169	52696169		62	4
Prostate Aden...	TCGA-EJ...	Prostate Adenocarcin...	V152F	○	Missense	Diploid		3	52696223	52696223	0.05	4	4
Prostate Canc...	CPCG0072	Prostate	L145I	○	Missense			3	52696244	52696244		1406	4
Metastatic cas...	P-001292...	Prostate Adenocarcin...	D165Y	○	Missense	Diploid		3	52696184	52696184	0.18	44	4
Prostate Aden...	TCGA-EJ...	Prostate Adenocarcin...	V152F	○	Missense	Diploid		3	52696223	52696223	0.05	3	4
Metastatic Pro...	PRAD-01...	Prostate Adenocarcin...	R202C	○	Missense	Diploid		3	52692256	52692256	0.41	577	5
Metastatic Pro...	MO_1473...	Prostate Adenocarcin...	N258Kfs*6	●	FS ins	Gain	1	3	52682399	52682400		85	7
Prostate Aden...	MO_1473	Prostate Adenocarcin...	N258Kfs*6	●	FS ins	Diploid	1	3	52682399	52682400	0.11	150	7
Prostate Aden...	PR-04-33...	Prostate Adenocarcin...	S267C	○	Missense	Diploid		3	52682373	52682373		30	7
Prostate Aden...	PR-04-33...	Prostate Adenocarcin...	S267C	○	Missense	Diploid		3	52682373	52682373	0.05	35	7
Prostate Aden...	P-001082...	Prostate Adenocarcin...	K243R	○	Missense	Diploid		3	52682445	52682445	0.23	9	7
Prostate Canc...	P-000379...	Prostate Adenocarcin...	Y281C	○	Missense	Diploid	1	3	52678777	52678777		2	8
Prostate Canc...	P-000684...	Prostate Adenocarcin...	F280L	○	Missense	Diploid		3	52678781	52678781		9	8
Metastatic cas...	P-000379...	Prostate Adenocarcin...	Y281C	○	Missense	Diploid	1	3	52678777	52678777	0.08	2	8
Prostate Aden...	P-000379...	Prostate Adenocarcin...	Y281C	○	Missense	Diploid	1	3	52678777	52678777	0.08	2	8
Prostate Aden...	P-000684...	Prostate Adenocarcin...	F280L	○	Missense	Diploid		3	52678781	52678781	0.41	9	8
Prostate Aden...	TCGA-XK...	Prostate Adenocarcin...	P427L	○	Missense	Diploid	1	3	52668639	52668639	0.35	6524	11
Metastatic cas...	P-001292...	Prostate Adenocarcin...	R397Q	○	Missense	Diploid		3	52668729	52668729	0.19	44	11
Prostate Aden...	TCGA-XK...	Prostate Adenocarcin...	P427L	○	Missense	Diploid	1	3	52668639	52668639	0.35	6042	11

Figura 3a. Herramienta cBioPortal y OncoKB. Mutaciones clínicamente relevantes encontradas en el gen PBRM1 en pacientes con CaP

MUTACIONES CLÍNICAMENTE RELEVANTES

Study of Origin	Sample ID	Cancer Type Detailed	Protein Change	Annotation Ⓢ Ⓣ Ⓡ Ⓢ-¼	Mutation Type	Copy #	T	COSMIC	Chromosome	Start Pos	End Pos	Allele Freq (T)	# Mut in Sample	Exon (30 in total)
Metastatic Pro...	MO_147...	Prostate Adenocarci...	N258Kfs*6	Ⓢ	FS ins	Gain		1	3	52682399	52682400		85	7
Prostate Aden...	CH76T	Prostate Adenocarci...	X300_splice	Ⓢ	Splice	Diploid			3	52677363	52677363		45	
Neuroendocri...	WCMC1...	Castration-Resistant ...	X363_splice	Ⓢ	Splice				3	52675969	52675969	0.09	290	
Prostate Canc...	P-00047...	Prostate Adenocarci...	I1073Lfs*86	Ⓢ	FS del	Diploid		2	3	52620611	52620611		4	20
Prostate Canc...	P-00083...	Prostate Adenocarci...	X129_splice	Ⓢ	Splice	Diploid			3	52696294	52696294		4	
Prostate Canc...	ICGC_P...	Prostate	Q170*	Ⓢ	Nonsense			2	3	52696169	52696169		62	4
Metastatic ca...	P-00083...	Prostate Adenocarci...	X129_splice	Ⓢ	Splice	Diploid			3	52696294	52696294	0.05	4	
Metastatic ca...	P-00122...	Prostate Adenocarci...	R1160*	Ⓢ	Nonsense	Diploid			3	52610695	52610695	0.08	35	22
Prostate Aden...	MO_1473	Prostate Adenocarci...	N258Kfs*6	Ⓢ	FS ins	Diploid		1	3	52682399	52682400	0.11	150	7
Prostate Aden...	10362	Prostate Adenocarci...	X363_splice	Ⓢ	Splice	Diploid			3	52675969	52675969	0.09	246	
Prostate Aden...	P-00047...	Prostate Adenocarci...	I1073Lfs*86	Ⓢ	FS del	Diploid		2	3	52620611	52620611	0.40	4	20
Prostate Aden...	P-00083...	Prostate Adenocarci...	X129_splice	Ⓢ	Splice	Diploid			3	52696294	52696294	0.05	4	
Prostate Aden...	P-00162...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-GLYCTK fusion	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			4	
Prostate Aden...	P-00138...	Prostate Adenocarci...	SMG1-PBRM1 fusion	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			3	
Prostate Canc...	P-00023...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-intragenic	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			1	
Metastatic ca...	P-00023...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-intragenic	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			4	
Prostate Aden...	P-00023...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-intragenic	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			1	
Prostate Aden...	P-00159...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-intragenic	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			4	
Prostate Aden...	P-00301...	Prostate Adenocarci...	PBRM1-ZNF385D-AS2 fusion	Ⓢ	Fusion	Diploid			NA	-1			3	

Figura 3b. Herramienta cBioPortal y OncoKB. Mutaciones clínicamente relevantes encontradas en el gen PBRM1 en pacientes con CaP.

Tomando en cuenta estos hallazgos, se diseñaron los primers de secuenciación, para los exones 4, 7, 8 20 y 22. Previamente Xun Xu y cols (2012) describieron primers específicos para secuenciar el gen PBRM1 en cáncer renal, los cuales sirvieron como comparativo para determinar el adecuado funcionamiento (amplificación) de nuestros primers (Xu X, 2012).

Todos los primers fueron diseñados para incluir la totalidad del exón, aun cuando la longitud de amplificación de pares de bases incluyera regiones intrónicas fuera del exón, esto se hizo con la finalidad de no fragmentar la amplificación en algún sitio dentro del exón objetivo. Los primers se diseñaron utilizando la herramienta bioinformática Primer Blast. La siguiente tabla ilustra los primers que fueron diseñados, y su comparación con los primers homónimos diseñados por Xun Xu y colaboradores:

Exón	Primers diseñados		Primers descritos por Xun Xu y colaboradores (2012)	
	Forward 5'	Reverse 3'	Forward 5'	Reverse 3'
4	TATGCTCTGTCACCTTGAATGTTG	AAGAACTACTACTCACCTGCCA	AGTATGCCTCTTGTCCCTTG	AAGGGTGCTTTATTCATTGG
7	TAGTCTTGAATCTCACAAAGCTGC	TAACCCCTTACAGAGACAAC TAGC	TGGCACTGACAAAATCTGTT	ATCCCAACTTTGGACACAAT
8	ATGCAGCTCTGGTTTTGTTACCTA	CCAGGCTCATTATAAGTTTTGGC	AAGTGTTCCTGCCTCATTCC	AAGAGATCTGCCCACTTCAG
20	TTCCACCTGGCTACACGAAAA	AGCAAGTGGTCTTTCACAACG	CAAGCTGGTCTTGAACCTCT	GCTTTTGCCTCCTTACTTTG
22	AGTCTGCTTTCGTTTCTTACCTTCT	ACTTTTGTCTTCATCCGAAGGG	GTACTTCCCAAACCAGCAAA	GTTTCCTCGGCTAAGATTGA

Tabla 3. Comparación entre los primers diseñados por nuestro equipo y los descritos previamente en la literatura ³⁴

6.6 Reacción en cadena de polimerasa (*Polymerase Chain Reaction - PCR*)

Se estandarizó una amplificación por PCR a 40 ciclos, utilizando los “primers” diseñados por nosotros y los “primers” previamente publicados en la literatura. Utilizando un gel de agarosa, mediante electroforesis a 70 V por 1 hora, se realizó una comparación entre los “primers” de los exones fabricados por nosotros contra los “primers” de los exones diseñados por Xun Xu y colaboradores. Se utilizó una muestra de CaP y una de hiperplasia prostática benigna (HPB), de un paciente control sin cáncer, para realizar la primera PCR y estandarización de la técnica, los “primers” diseñados amplificaron satisfactoriamente en ambas muestras. La Figura 4 ilustra la electroforesis en gel, de las amplificaciones de cada exón diseñado, de cada exón previamente descrito por Xun Xu y colaboradores, así como para cada muestra, CaP e hiperplasia prostática benigna.

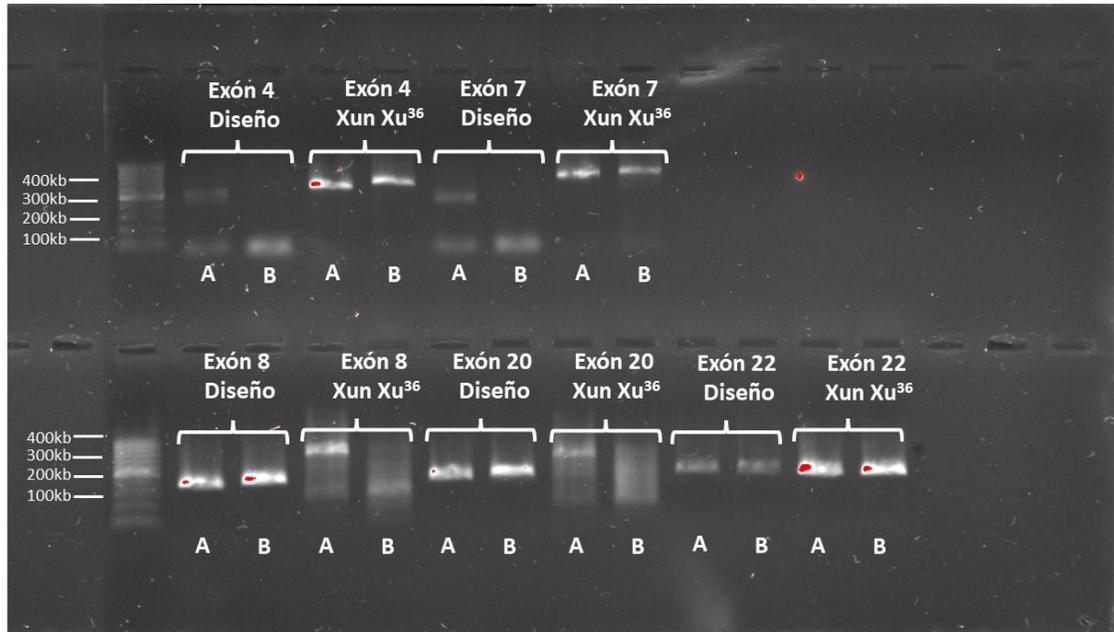


Figura 4. Electroforesis de las amplificaciones realizadas con cada exón, diseñado y previamente descrito, para cada tejido, CaP (A) y HPB (B).

7. DISCUSIÓN

7.1 Población de pacientes con cáncer de próstata

Nuestra población de 26 pacientes representa una porción relativamente pequeña del total de pacientes registrados en la base epidemiológica (405 pacientes, 6.4%), sin embargo, es una muestra suficientemente grande para realizar un análisis piloto de secuenciación en nuestra población, específicamente para análisis de un solo gen, el PBRM1. Berger y cols (2011) realizaron los primeros estudios de secuenciación masiva de DNA genómico en una población pequeña, usando DNA de tan solo 7 pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo. Nickerson y cols (2013) fueron los primeros en reportar mutaciones significativas en PBRM1, en pacientes con cáncer de próstata, con estadios avanzados, particularmente metastásicos, utilizando únicamente una población de 5 pacientes, encontrando múltiples mutaciones somáticas en PBRM1, predominantemente en tejido tumoral metastásico. Grasso y cols (2012), de igual manera, realizaron secuenciación

masiva en una población relativamente pequeña, utilizando 50 pacientes, apenas el doble de nuestra población incluida hasta el momento, reportando un paciente con mutaciones significativas en PBRM1. Nuestro reclutamiento de pacientes continúa, si bien hasta el momento llevamos un pequeño porcentaje del total del universo existente, sabiendo que podremos alcanzar una muestra suficiente para un análisis significativo.

7.2 Características clínicas y oncológicas de la población

De los estudios previamente mencionados reportando mutaciones presentes en PBRM1, el estudio publicado por The Cancer Genome Atlas Research Network (2015), es quizás el más representativo, analizaron 333 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer de próstata en tejido prostático, sin embargo, únicamente incluyeron pacientes con cáncer de próstata localizado, debido a la ausencia de análisis molecular de tejido metastásico, contrastaron sus resultados con los publicados previamente en otro artículo de pacientes con cáncer de próstata metastásico. Nuestra población incluye pacientes de todos los estadios de cáncer de próstata, pacientes con enfermedad localizada, localmente avanzada y metastásicos al diagnóstico. La posibilidad de analizar mutaciones somáticas en PBRM1 en pacientes de distintos estadios al momento de la obtención del tejido prostático supone una posibilidad de encontrar resultados novedosos con respecto a los publicados previamente en la literatura. Es quizás la ausencia de tejido tumoral metastásico o ganglionar la única desventaja de nuestro estudio para poder obtener una información completa en el caso de pacientes con cáncer de próstata avanzado. Berger y cols (2012) y Grasso y cols (2013) incluyeron una población poco heterogénea, compuesta predominantemente por pacientes con resultados histopatológicos de Gleason elevados, nuestra población se compone de pacientes de todos los Grupos de Gleason histopatológico, permitiendo tener una población para representativa, con la posibilidad de establecer, una vez que se realice la secuenciación del gen PBRM1, la presencia de mutaciones específicas en dicho gen, en pacientes con Gleason bajo, lo cual no se ha reportado detalladamente hasta el momento en la literatura.

7.3 Seguimiento clínico y desenlace oncológico

El objetivo más ambicioso de nuestro estudio es la correlación entre el desenlace oncológico y la presencia de mutaciones en el gen PBRM1. De los estudios publicados ninguno ha estudiado el desenlace oncológico de pacientes con mutaciones en dicho gen. Grasso y cols (2012) realizaron su análisis molecular en pacientes con CaP resistente a castración en muestras obtenidas de autopsias de pacientes inmediatamente al fallecer secundario a cáncer de próstata, sin embargo, no se realizó ningún tipo de análisis estadístico de supervivencia en dichos pacientes. La mayoría de los estudios que han reportado mutaciones en PBRM1, han estudiado pacientes con CaP avanzados (Berger, 2012; Nickerson 2013; Grasso 2012), lo cual impide determinar conclusiones relacionadas con el PBRM1 en el CaP en etapas iniciales. De los ensayos clínicos aleatorizados más relevantes respecto al tratamiento y seguimiento de los pacientes con CaP no metastásicos son el estudio PIVOT (Wilt TJ, 2012) y el estudio ProtecT (Hamdy FC, 2016), encontrando que no existe diferencia significativa en la supervivencia a 10 años en pacientes de estadios no avanzados respecto al tratamiento recibido, vigilancia, prostatectomía o radioterapia; nuestra población incluida hasta el momento se compone de pacientes que han recibido todas las distintas modalidades de tratamiento para CaP, lo cual nos permitirá obtener resultados adicionales respecto a la correlación de mutaciones en PBRM1 y el desenlace oncológico en los distintos grupos de tratamiento para CaP. Otra ventaja de nuestro estudio radica en que, al ser una cohorte histórica de la cual contamos con datos suficientes de seguimiento de más dos años posteriores al diagnóstico histopatológico, podremos obtener resultados de análisis de supervivencia en pacientes con mutaciones presentes en PBRM1, contrastándolos contra los pacientes sin mutaciones, para los distintos estadios oncológicos, los distintos grupos de Gleason (ISUP), Grupos de Riesgo EAU y los distintos tratamientos.

7.4 Diseño de los “primers” para el gen PBRM1

Xu X y cols (2012) realizaron secuenciación de células de cáncer renal, dentro de los genes estudiados, el PBRM1 fue uno de ellos. Para realizar secuenciación de

exoma del PBRM1 diseñaron “primers” específicos para los 32 exones del PBRM1, logrando cubrir más del 80% de las regiones exómicas del gen. Tal como se describió previamente, nuestros “primers” diseñados, si bien son específicos para los exones 4, 7, 8, 20 y 22, son completamente funcionales, y nos permitirán amplificar y secuenciar (una vez que podamos iniciar dicha etapa del protocolo) los exones que sabemos tienen la mayor cantidad de mutaciones clínicamente relevantes previamente encontradas para CaP.

8. CONCLUSIONES

8.1 Implicaciones para la práctica clínica

Los pacientes incluidos hasta el momento representan una muestra heterogénea pero perfectamente representativa de pacientes con CaP, se han incluido pacientes de todos los Grupos de Gleason (ISUP), así como de todos los estadios y Grupos de Riesgo EAU. Cuentan con un seguimiento mínimo de 2 años, lo cual permitirá, una vez realizado el análisis de secuenciación, un análisis de supervivencia acorde a los objetivos específicos propuestos.

8.1 Implicaciones para las direcciones futuras de investigación

Nuestro protocolo de investigación cuenta con autorización por parte del Comité de Ética e Investigación del Hospital Dr. Manuel Gea González, con actual extensión para la continuación de la recolección de las muestras y revisión de expedientes clínicos, hasta diciembre del 2023. Dicha extensión permitirá continuar el estudio hasta completar el mismo.

La recolección de muestras de pacientes continúa activa y presente por nuestra parte y por el Departamento de Patología del Hospital Dr. Manuel Gea González, con la búsqueda de los bloques de parafina y la subsecuente revisión histopatológica de las mismas, con el fin de confirmar la presencia de CaP, en las medias y tiempos que las necesidades clínicas diarias de dicho servicio lo permiten.

La secuenciación se realizará en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, una vez que se haya logrado la reactivación completa de los protocolos de secuenciación en el Instituto. Hasta el momento, los “primers” diseñados para los

exones que se estudiarán, son completamente funcionales, habiendo sido comparados con “primers” previamente descritos en la literatura.

Una vez realizadas las primeras pruebas de secuenciación de los pacientes incluidos, podremos elaborar análisis estadísticos y conclusiones a los objetivos específicos propuestos en el estudio.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Gandaglia G, Leni R, Brfay F, Fleshner N, Freedland SJ, Kimbel A, Stattin P, et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *European Urology Oncology*. 2021; 4: 877-892. DOI: 10.1016/j.euo.2021.09.006
2. Schrecengost RS, Knudsen KE. Molecular Pathogenesis and Progression of Prostate Cancer. *Semin Oncol*. 2013; 40(3): 244-258.
3. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017; 7(5):1016-1036.
4. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*. 2011 ; 470(7333) : 214-220.
5. Watson PA, Arora V, Sawyers CL. Emerging Mechanisms of Resistance o Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15(12): 701-711.
6. Sumiyoshi T, Mizuno K, Tamasaki T, Miyazaki Y, Makino Y, Okasho K, Utsunomiya N, et al. Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep*. 2019; 9(1):4030.
7. Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental Evidence of Persistent Androgen-Receptor-Dependency in Castration-Resistant Prostate Cancer. *It J Mol Sci*. 2013; 14: 15615-15635.
8. Ruggero K, Farran-Matas S, Martinez-Tebar A, Aytes A. Epigenetic Regulation in Prostate Cancer Progression. *Current Molecular Biology Reports*. 2018. 4:101-115.

9. Xu K, Wu Z, Groner A, He H, Cai Ch, Lis R, Wu X, et al. EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells is Polycomb-Independent. *Science*. 2012; 338: 1465- 69.
10. Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene*. 2009; 28:1653-1668.
11. Biegel JA, Busse TM, Weissman BE. SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Cancer. *American Journal of Medical Genetics*. 2014; 166:350-366.
12. Wilson B, Roberts Ch. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Cancer*. 2011; 11(7): 481-92.
13. De Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, Rocha RM, da Cunha IW, Carraro DM, Guimaraes GC, de Cassio Zegui S. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2014 May;113(5b):E157-63.
14. Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*. 2011; 469 (7331):539-542.
15. Thompson M, Polybromo-1: the chromatin targeting subunit of the PBAF complex. *Biochimie*. 2009;91(3):309-19.
16. Samowska E, Gratkowska D, Sacharowski S, Owiek P, Tohge T, Fernie A, Siedlecki J, et al. The Role of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Hormone Crosstalk. *Trends Plant Sci*. 2016; 21(7): 594-608.
17. Jeong K, Lee Y, Stallcup M. Recruitment of the SWI/SNF Chromatin Remodelling Complex to Steroid Hormone-regulated Promoters by Nuclear Receptor Coactivator Fightless. *J. Biol. Chem*. 2009; 284(43): 29298-309.
18. Porter EG, Dykhuizen EC. Individual Bromodomains of Polybromo-1 Contribute to Chromatin Association and Tumor Suppression in Clear Cell Renal Carcinoma. *J Biol Chem*. 2017;292(7):2601-2610.
19. Horikawa I, Barrett JC. cDNA Cloning of the Human Polybromo-1 Gene on Chromosome 3p21. *DNA Seq*. 2002;13(4):211-5.

20. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), (20/12/2018)
World Wide Web URL: <https://www.omim.org/entry/606083>
21. Gene (Internet). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2018-(citado 20/12/2018). Wide Web URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55193>
22. UniProt: universal protein knowledgebase. (citado 20/12/2018). World Wide Web URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q86U86>
23. Ensembl Project. (citado 20/12/2018). World Wide Web URL: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000163939;r=3:52545352-52685917.
24. Slaughter MJ, Shanle EK, McFadden AW, Hollis ES, Suttle LE, Strahl BD, Davis IJ. PBRM1 bromodomains variably influence nucleosome interactions and cellular function. *J Biol Chem*. 2018; 293(35): 13592-13603.
25. Piva F, Giuletti M, Occhipinti G, et al. Computational análisis of the mutations in BAP1, PBRM1 and SEDT2 genes reveals the impaired molecular processes in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6(31):32161-8.
26. Brugarolas J, PBRM1 And BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer J*. 2013;19(4):324-32.
27. Barbieri Ch, Baca S, Lawrence M, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, White T, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1, and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2012; 44(6): 685-689.
28. Grasso Ch, Wu Y, Robinson D, Cao X, Dhanasekaran S, Khan A, Quist M, Lonigro R, et al. The mutational landscape of lethal castrate resistant prostate cancer. *Nature*. 2012; 487(7406): 239-43.
29. Nickerson M, Im K, Misner K, Tan W, Lou H, Gold B, Wells D, Bravo H, Fredrikson K, Harkins T, et al. Somatic alterations contributing to metastasis of castration resistant prostate cancer. *Hum Mut*. 2013; 34(9): 1231-41.
30. The Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *CellPress*. 2015; online: DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.025

31. Hopson S, Thompson M. BAF180: Its roles in DNA Repair and Consequences in Cancer. *ACS Chem Biol.* 2018; 12:2482-2490.
32. Urbanucci A, Mills IG. Bromodomain-containing proteins in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2018; 462:31-40
33. Mota S, Vecchi L, Zoia M, Oliveira F, Alves D, Dornelas B, Bezerra S, et al. New Insights into the Role of Polybromo-1 in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 2852.
34. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Bourke L, Cornford P, et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. EAU Annual Congress Milan 2021. Online: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>
35. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol.* 2016; 40:244–252
36. Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, Li F, et al. Single-Cell Exome Sequencing Reveals Single-Nucleotide Mutation Characteristics of a Kidney Tumor. *Cell.* 2012; Online DOI 10.1016/j.cell.2012.02.025
37. Wilt TJ, Jones KM, Barry MJ, Adriole GL, Culkin D, Wheeler T, et al. Follow-up of Prostatectomy versus Observation for Early prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 377(2):132-142. doi: 10.1056/NEJMoa1615869
38. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2016; 375(15): 1415-1424. doi: 10.1056/NEJMoa1606220