

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES  
CIRCULANTES DE CÁNCER DE PRÓSTATA

POR

M.C. JESÚS ROLANDO DELGADO BALDERAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

AGOSTO 2020

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES  
DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

**Aprobación de Tesis:**



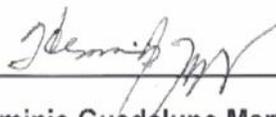
---

**Dr. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**  
Directora



---

**D. med. Lauro Salvador Gómez Guerra**  
Co-Director



---

**Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**  
Miembro de la Comisión



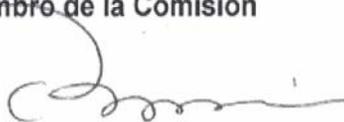
---

**Dra. med. Raquel Garza Guajardo**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. C. Hugo Leonid Gallardo Blanco**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de estudios de posgrado

## COLABORADORES

M.S.E Juan Felipe Yee de León, de Delee Corp.

LBG Dianra Aráiz Hernández, de Delee Corp.

Biól. Brenda Soto García, de Delee Corp.

Lic. Física Alejandro Abarco Blanco, de Delee Corp.

Lic. Liza Paola Velarde, de Delee Corp.

Dr. Miguel Esparza Gurrola, de Delee Corp.

Dr. Carlos Avelar Aguilar, de Delee Corp.

Dr. David Hernández Barajas, del Centro Universitario Contra el Cáncer, UANL.

Dra. Melissa Náñez Marín, Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología, HU.

Dr. Marco Alberto Ocaña Munguía, Servicio de Urología, HU.

Dr. Guillermo Vizcarra Mata, Servicio de Urología, HU.

Dr. Aldo García Bailón, Servicio de Urología, HU.

Dr. Hassan Beltrán del Río, Servicio de Urología, HU.

Lic. Eduardo Coronado, Servicio de Urología, HU.

## Lugares de trabajo del estudio

El presente trabajo se desarrolló en las siguientes instituciones:

- Laboratorio de la Unidad Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
- Laboratorios de Delee Corp.
- Servicio de Urología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.
- Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## Dedicatoria

*A André, Isabella y Angela, mi familia.*

*A Rolando, Leticia y Alexis, mis padres y hermano.*

*A la memoria de mis abuelos David, Tina y Ramón*

*A la memoria de mis profesores:*

*los Drs. Benito Mata y Dr. Héctor Menchaca*

*A todos los pacientes con cáncer.*

## **Agradecimientos**

La culminación de este ciclo de la vida no habría sido posible sin el apoyo de mucha gente, a todos ustedes les dedico un pequeño agradecimiento y espero que la vida me alcance para retribuirles un poco de lo que han hecho por mí.

A mi guapa esposa y mis increíbles hijos por estar junto a mí en este largo viaje y ser mi inspiración.

A mis padres que desde siempre han velado por que reciba la mejor educación posible y por siempre estar al pendiente de mí en esta última etapa de mi formación profesional y por sus grandes sacrificios por nuestra educación.

Un agradecimiento muy especial a Felipe Yee, Liza Velarde y Alejandro Abarca de Delee Corp. porque desde el primer día que les conocí me abrieron las puertas de su laboratorio y me han hecho sentir parte de ellos, además de apoyar siempre a un servidor y a mi familia ante cualquier adversidad. También al resto de mis compañeros administrativos y de laboratorio de la misma empresa. Todos son unas personas increíbles.

A la Dra. Celia Sánchez por aceptarme como su estudiante y porque siempre me ha brindado su atención, libertad para trabajar y apoyarme en los buenos y malos momentos.

Al Dr. Lauro Gómez por ser para mí un maestro de vida y por invitarme a trabajar en sus proyectos de investigación, además por brindarme muchísimo su apoyo a

lo largo de estos primeros 5 años y por siempre estar pendiente de las necesidades humanas y académicas de un servidor.

A la Dra. Herminia Martínez por volver a abrirme las puertas del Departamento cuando estaba a cargo de la Jefatura, por su incansable apoyo y por siempre velar por las causas justas de los estudiantes. Sin su ayuda no habría podido llegar hasta aquí.

A la Dra. Raquel Garza por su apoyo cuando decidí integrarme al programa de doctorado, por siempre estar dispuesta a proporcionar su conocimiento a este proyecto y por la invitación a realizar colaboraciones con su equipo de trabajo.

A la Dra. Melissa Náñez por su apoyo y aportaciones para el proyecto.

Al Dr. Hugo Gallardo por su enorme compromiso y apoyo para el proyecto, por la gran paciencia para trabajar juntos y por siempre estar al pendiente de mis necesidades.

Al Dr. Adrián Gutiérrez por darme la oportunidad de trabajar para el Servicio de Urología durante la transición entre los grados de maestría y doctorado.

También a los compañeros doctores del Servicio de Urología: Marco Ocaña, Guillermo Vizcarra, Aldo García, Hassan Beltrán, Iván Robles, Fred Montelongo, David Fernández y Eduardo Coronado, quienes en algún momento durante este tiempo contribuyeron con algo en este trabajo. También al personal académico, administrativo y de residentes quienes siempre estuvieron al pendiente mío y me apoyaron.

A la Dra. Ana María Rivas, Jefa del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, quien durante la segunda parte de mi programa de doctorado estuvo al pendiente y siempre con la mejor disposición de apoyarme.

Al Dr. David Hernández por su gran disposición y compromiso para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica quienes forman una familia muy especial y que fungen como gran apoyo para un servidor. Lo mismo para mis compañeros de laboratorio y estudiantes de servicio social o de estancias académicas que han pasado por aquí.

A mi amigo Juan Pablo Zamacona por aconsejarme a tomar el trabajo de urología, sin ese empujón quizá esta historia habría sido diferente.

Finalmente a mi grupo de amigos Felipe Yee, Guillermo Guerrero, Mauricio de la Rosa, Brenda Díaz, Iván Szyszko, Victoria Guerra, Gerardo Lozano, Enrique Zamacona, Jorge Meza, Karina Flores, José Manuel Martínez y Adriana Rodríguez, muchas gracias por sus contribuciones e incansable apoyo, todos ustedes son otra pequeña familia muy importante para mí.

*Gracias totales.*

*Rolando.*

## Listado de Figuras

- **A49T:** Alanina49Treonina.
- **ADT:** Androgen Deprivation Therapy.
- **AR:** Androgen Receptor
- **BSA:** Bovine Serum Albumine.
- **BTR:** Biopsia Transrectal.
- **CAMLs:** Cancer-associated macrophage-like cells.
- **CaP:** Cáncer de próstata.
- **CD45:** Cluster of Differentiation 45
- **cDNA:** Complementary Deoxyribonucleic Acid.
- **cDNA:** Complementary Deoxyribonucleic Acid.
- **CI:** Confidence Interval.
- **CK:** Citoqueratina.
- **CTCs:** Células Tumorales Circulantes.
- **DBD:** DNA Binding Domain.
- **DHT:** Dihidrotestosterona
- **DMT2:** Diabetes Mellitus Tipo 2.
- **DNA:** Deoxiribonucleic Acid.
- **DRE:** Digital Rectal Examination.
- **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic Acid.
- **EMT:** Epithelial Mesenchymal Transition.
- **FDR:** False Discovery Rate.
- **FFPE:** Formalin-Fixed Paraffine Embedded.
- **HWE:** Hardy-Weinberg Equilibrium.
- **IMC:** Índice de Masa Corporal.
- **IQR:** Interquartile Range.
- **ISUP:** International Society.
- **kDa:** kilo Dalton
- **LBD:** Ligand Binding Domain.
- **mCRPC:** metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer
- **min:** Minuto.
- **mL:** Mililitro.
- **mRNA:** Messenger Ribonucleic Acid.
- **ms:** milisegundos.
- **NCCN:** National Cancer Comprehensive Network.
- **ng:** Nanogramo.
- **nm:** Nanómetro.
- **NTD:** N-Terminal Domain.
- **pb:** Pares de Bases.
- **PBS:** Phosphate-Buffered Saline.
- **PBS-T:** Phosphate-Buffered Saline-Tween 20.
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction.
- **PSA:** Prostate.

- **PSMA:** Prostate Specific Membrane Antigen.
- **qPCR:** Quantitative Polymerase Chain Reaction.
- **RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.
- **RNA:** Ribonucleic Acid.
- **RSD:** Relative Standard deviation.
- **rt-PCR:** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.
- **SEM:** Scanning Electron Microscopy.
- **SEM:** Standard Error of the Mean.
- **SNP:** Single Nucleotide Polymorphism.
- **SNV:** Single Nucleotide Variant.
- **UTR:** Untraslate Region
- **v/v:** Volumen.
- **V89L:** Valina89Leucina.
- **µg:** Microgramo.
- **µL:** Microlitro.
- **µm:** Micrometro.
- **µM:** Micromolar.

## Índice General

	Resumen	1
1	Introducción	3
1.1	Histología del cáncer de próstata	4
1.2	Factores de riesgo	6
1.2.1	Edad	7
1.2.2	Origen étnico	7
1.2.3	Factores hormonales	8
1.2.4	Factores genéticos	9
1.2.5	Factores ambientales y estilo de vida	11
1.3	Métodos de diagnóstico del CaP	11
1.3.1	Antígeno Prostático Específico	12
1.3.2	Tacto dígito rectal	16
1.3.3	Biopsia prostática	17
1.4	Manejo y decisiones clínicas para el tratamiento del CaP	18
1.5	Medicina de precisión y la ciencia translacional	23
1.6	Biopsias líquidas y Células Tumorales Circulantes	29
2	Justificación	36
3	Objetivos	38
4	Material y métodos	39
4.1	Autorización del Comité de Ética en Investigación	39
4.2	Metodología del objetivo 1	39
4.2.1	Cultivo celular de líneas tumorales de próstata	40
4.2.2	Análisis de eficiencia de captura	41
4.2.3	Sistema de imagen y visualización de las muestras	43
4.2.4	Análisis de viabilidad de las células tumorales en muestras contaminadas.	44
4.2.5	Desarrollo de una prueba molecular con potencial uso en células tumorales circulantes.	45
4.3	Metodología del objetivo 2	50
4.3.1	Tipo de estudio y obtención de muestras	50
4.3.2	Procesamiento de las muestras de sangre	51
4.3.3	Inmunotinción in-situ	52
4.3.4	Análisis de las membranas	53
4.3.5	Identificación de CTCs	53
4.3.6	Análisis estadístico	53
4.4	Metodología del objetivo 3	54
4.4.1	Tipo de estudio y selección de sujetos de investigación.	54
4.4.2	Recolección de muestras	55
4.4.3	Procesamiento de las muestras	55
4.4.4	Extracción, cuantificación y análisis de calidad de ADN	56
4.4.5	Electroforesis en gel de agarosa al 1%	58
4.4.6	PCR punto final de un fragmento del gen de $\beta$ -globina	58
4.4.7	Genotipificación	59
4.4.6	Análisis estadístico	60

5	Resultados	62
5.1	Resultados del objetivo 1	62
5.1.1	Caracterización morfológica de la membrana	62
5.1.2	Caracterización del sistema de procesamiento de imagen de CTC	63
5.1.3	Variación entre la velocidad de procesamiento y los tamaños de poro de la membrana de filtración	70
5.1.4	Análisis de la pureza de las muestras procesadas	72
5.1.5	Ensayos de viabilidad de las células capturadas	74
5.1.6	Prueba molecular con potencial uso en CTCs	75
5.2.	Resultados del objetivo 2	78
5.3	Resultados del objetivo 3	83
5.3.1	Características clínicas de los casos y controles enrolados en el estudio de genotipificación.	83
5.3.2	Análisis de la calidad del DNA obtenido	86
5.3.3	Genotipificación	87
5.3.4	Asociación de características clínicas y genéticas	88
6	Discusiones	93
6.1	Objetivos 1 y 2	93
6.2	Objetivo 3	110
7	Conclusiones	124
8	Referencias	126

## Listado de figuras

Figura 1	Características de la estadificación Gleason	5
Figura 2	Árbol genealógico de un paciente con CaP	10
Figura 3	Esquema general desde el tamizaje hasta el seguimiento del paciente de CaP	13
Figura 4	Progresión típica del cáncer de próstata metastásico	19
Figura 5	Mecanismo general de acción de andrógenos	20
Figura 6	Rol del AR en la progresión del ciclo celular	27
Figura 7	Blanco de estudio de las ciencias ómicas	29
Figura 8	Primera observación de CTCs	30
Figura 9	Biopsia líquida en cáncer	31
Figura 10	Fundamentos de tecnología de separación de CTCs	33
Figura 11	Componentes del nuevo dispositivo Cytocatch	35
Figura 12	Microscopía electrónica de barrido de las membranas	62
Figura 13	Resultados de los conteos de células por imagen	65
Figura 14	Imagen típica generada por el algoritmo	67
Figura 15	Resultados de los conteos por imagen entre plataformas	69
Figura 16	Eficiencias de captura calculada	71
Figura 17	Pureza obtenida analizando los diferentes tamaños de poro	73
Figura 18	Gradiente de temperatura fragmento 181 pb	75
Figura 19	Gradiente de concentración de cDNA de LNCaP	76
Figura 20	Análisis de fragmentos del AR y de secuenciación de la región de 878 pb	77
Figura 21	Enumeración de CTC en ambos grupos de estudio	81
Figura 22	Identificación de CTC y su análisis	82
Figura 23	Hallazgo de eventos raros encontrados en las muestras analizadas.	83
Figura 24	Análisis de la integridad del ADN	86
Figura 25	Amplificación del gen $\beta$ -globina	87
Figura 26	Estructura de policarbonato de una membrana de filtración	94
Figura 27	Observación de células tumorales en la membrana ISET.	95
Figura 28	Observación de células tumorales en la membrana ScreenCell	96
Figura 29	Vista típica de la transición epitelial mesenquimal en cáncer	105

## Listado de tablas

Tabla 1	Tipos histológicos y características generales del CaP	4
Tabla 2	Comparación entre los valores de PSA y los grupos de edad	14
Tabla 3	Condiciones de PCR de AR-599 PB	48
Tabla 4	Condiciones de PCR de AR-181 pb	49
Tabla 5	Tiempos de exposición encontrados entre ambas plataformas	66
Tabla 6	Conteos de CTC de los sujetos sanos	79
Tabla 7	Características de los pacientes con CaP.	80
Tabla 8	Características clínicas de los pacientes con CaP	84
Tabla 9	Características demográficas de los pacientes con CaP y los sujetos control.	89
Tabla 10	Equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencias genotípicas de A49T (rs9282858) y V89L (rs523349) en casos y controles.	90
Tabla 11	Análisis de asociación de las variantes A49T (rs9282858) y V89L (rs523349).	91
Tabla 12	Análisis de los genotipos de rs523349 (V89L) y variables clínicas.	92
Tabla 13	Efectos clínicos de la variante A49T (rs9282858) en otras poblaciones analizadas.	120
Tabla 14	Efectos clínicos de la variante V89L (rs523349) en otras poblaciones analizadas.	120

## Caracterización de células tumorales circulantes de cáncer de próstata

### Resumen

**Introducción:** El cáncer de próstata (CaP) es un problema de salud pública mundial. Las Células Tumorales Circulantes (CTCs) son atractivos biomarcadores para realizar abordajes clínicos precisos emitiendo resultados diagnósticos, pronósticos y de personalización de tratamientos; estas células guardan una proporción de una célula tumoral por cada billón de eritrocitos, es por ello que su estudio representa importantes desafíos tecnológicos. Por otro lado, en México son escasos los estudios que analicen características genéticas de la población afectada por este tumor; en el presente trabajo contribuimos a la caracterización y aplicación de una prueba piloto de aislamiento y enumeración de CTCs de pacientes con CaP y realizamos a la par la búsqueda de las variantes genéticas A49T y V89L de la enzima esteroidea 5 alpha-reductasa 2, así como sus posibles implicaciones clínicas en los sujetos de estudio. **Materiales y métodos:** El aislamiento de CTCs se realizó utilizando el nuevo dispositivo de microfiltración Cytocatch® empleando 7.5 mL de sangre; la eficiencia de captura fue realizada empleando las líneas celulares PC-3, LNCaP, DU145 y VCaP. El estudio piloto se realizó incluyendo una pequeña cohorte de casos de CaP metastásico y hombres sanos menores a 60 años en donde las CTCs fueron identificadas como células nucleadas PSMA+/CK+/CD45-, PSMA-/CK+/CD45- y PSMA+/CK-/CD45-; finalmente, realizamos una prueba de concepto de caracterización molecular de células tumorales buscando la mutación T878A presente en la línea celular LNCaP. Por otro lado, la genotipificación de las variantes genéticas fue realizada

mediante una PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan. **Resultados:** La caracterización de la nueva plataforma de microfiltración mostró que las condiciones óptimas para la separación de CTCs se lograron utilizando una membrana porosa de 7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro a un flujo de 2 mL/min; la eficiencia de captura calculada bajo estas condiciones fue del 93%-99%, con una pureza del 0.2% sin encontrar diferencia entre las líneas celulares. Para el estudio piloto de CaP, incluimos 8 casos de pacientes metastásicos y 8 hombres sanos. Las identificaciones nos permitieron determinar la mediana de 5 CTCs/mL de sangre (3-8 CTC/mL) para los controles, siendo este resultado la base para establecer el punto de corte de esta tecnología en 10 CTCs/mL de sangre; por otro lado, para los pacientes encontramos una media de 21 CTCs/mL (12-35 CTC/mL) con una diferencia estadística entre ambos grupos de  $p < 0.0001$ ; logramos establecer una prueba de concepto identificando una mutación de resistencia terapéutica en la línea celular LNCaP a un nivel de 6 células tumorales por mililitro de sangre. Para la genotipificación, realizamos un estudio de casos y controles donde incluimos 101 y 100 sujetos, respectivamente. No encontramos asociación entre el desarrollo de cáncer y las variantes A49T y V89L; sin embargo, encontramos un riesgo incrementado para el desarrollo de CaP y el uso de tabaco así como la exposición a la biomasa. **Conclusiones:** Se logró implementar una metodología para la separación y enumeración de células tumorales circulantes empleando una nueva plataforma de microfiltración celular, así como la identificación de un par de variantes genéticas de cáncer de próstata en población mexicana.

# **Caracterización de células tumorales circulantes de cáncer de próstata**

## **Capítulo 1**

### **1. Introducción.**

El cáncer de próstata (CaP), es un problema de salud pública mundial. La Organización Mundial de la Salud, a través de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), estimó para el año 2018 una incidencia de 1.3 millones de nuevos casos y 359,000 muertes. Las estadísticas mostradas por la IARC, posicionaron al CaP como el segundo cáncer más frecuente entre los hombres (1).

Para el año 2018, el CaP fue el tumor de mayor prevalencia entre los hombres mexicanos con 25,000 casos nuevos (en 2014, se reportaron 14,016 casos) y el de más alta mortalidad con 6,915 decesos. En nuestro país, este tumor produce la mayor cantidad de muertes entre la población mexicana, superando en número de los de mama y cérvico-uterino (1).

Ahora bien, el Estado de Nuevo León no cuenta con un estudio actual que muestre la incidencia y mortalidad que genera el CaP. Existe un antecedente de nuestro grupo de trabajo donde se realizó una campaña de tamizaje a través de la detección del antígeno prostático específico (PSA, del cual se hablará en el apartado de métodos de diagnóstico) donde de 973 sujetos tamizados se lograron detectar 55 pacientes con CaP (2).

## 1.1 Histología del cáncer de próstata

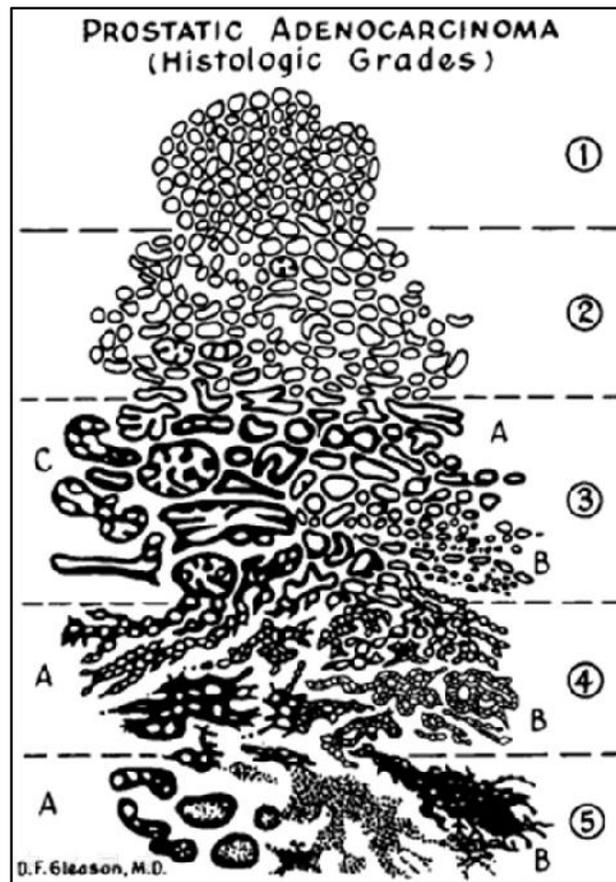
La histopatología del CaP lo categoriza en 5 grupos: adenocarcinomas acinares, ductales, de células pequeñas, células escamosas y células transicionales. El adenocarcinoma acinar es el tipo histológico que ocupa el 90% de los diagnósticos. La tabla número 1 resume una descripción general de los tipos de CaP que existen (3).

**Tabla 1. Tipos histológicos y características generales del CaP.**

<b>Tipo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Porcentaje</b>
Adenocarcinoma Acinar	Desarrollado en las células glandulares.	90%
Adenocarcinoma Ductal	Crece a partir de las células ductales de la próstata.	
Células pequeñas	Tipo neuroendocrino. Crecimiento acelerado y con características agresivas.	
Células escamosas	Crece a partir del epitelio que reviste la glándula prostática.	10%
Células transicionales	Generalmente inicia en el tejido adyacente a la próstata o en la vejiga y causa diseminación a próstata	

Es importante resaltar que el crecimiento de los tipos tumorales distintos al adenocarcinoma acinar es rápido y con características de mayor agresividad. Acompañado a la clasificación histológica, los patólogos expertos en los tumores urológicos deben determinar el grado de diferenciación celular de un CaP, esto se realiza mediante la escala Gleason, la cual data de la década de 1960 (4, 5).

Previamente se ha mencionado que la escala Gleason determina el grado de diferenciación glandular de la próstata y el patrón de crecimiento que tiene hacia el tejido estromal, tal y como se ilustra en la figura número 1.



**Figura 1. Características tumorales de la estadificación Gleason (6): Se observan 1) formas nodulares con bordes bien definidos, células ovales y**

glándulas de tamaño uniforme; 2) masas menos diferenciadas y circunscritas compuestas por células ovales separadas con variaciones de tamaño y forma; 3) masas y cilindros con bordes redondeados e infiltrantes, así como glándulas sencillas separadas con forma y tamaño variable en donde se distinguen formas angulares y retorcidas con amplia separación del estroma; 4) se observa una tumoración de forma entrecortada e infiltrante con glándulas fusionadas con alta permeabilidad hacia el estroma; 5) formaciones de cilindros redondeados y masas sólidas o cribiformes con necrosis central.

Tanto al grado de diferenciación glandular del tejido prostático (grado de patrón primario), como el patrón de crecimiento rumbo al estroma (grado de patrón secundario) de la próstata, se les asignan los valores mencionados de 1 a 5 y son sumados. Por ejemplo si el grado de diferenciación glandular de una biopsia prostática es 5 y el crecimiento hacia el estroma es de 4, estaríamos hablando de un CaP con un valor de Gleason 9 (5+4). El grado de patrón primario es el área predominante en la biopsia y si es el único presente o bien si el patrón de crecimiento secundario está en una proporción menor al 3%, el valor de Gleason debe ser multiplicado por un factor de 2 (6).

## **1.2 Factores de riesgo**

Según las guías de la Sociedad Americana de Cáncer (7), existen algunos factores de riesgo bien conocidos para el CaP:

- Edad
- Origen étnico

- Factores hormonales
- Factores genéticos
- Factores ambientales

### **1.2.1 Edad**

La mayoría de los CaP tienen como particularidad una lenta progresión (mayor al 90% de los casos) y en general se presentan en edades no menores a 50 años; es bien sabido que la próstata es un órgano que inicia un crecimiento acelerado hacia la cuarta década de vida. Es por eso que para hombres sin antecedentes familiares de CaP o de alguna condición genética que pudiera promover su desarrollo, se recomienda que a partir de los 50 años se realicen al menos una prueba de tamizaje como el antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés); países como Estados Unidos o algunos de Europa tienen intensas campañas de tamizaje orientadas a hombres de esa edad (8).

### **1.2.2 Origen étnico**

La carga genética provista por la diversidad étnica de las poblaciones alrededor del mundo es un factor de riesgo importante para la presentación del CaP. Es bien sabido que los hombres de origen afroamericano tienen un riesgo incrementado sobre los caucásicos americanos de padecer CaP (9), lo mismo sucede para hombres de raza negra provenientes de poblaciones jamaicanas y brasileñas, siendo esta última el resultado del mestizaje entre amerindios, europeos y grupos americanos (10, 11).

El CaP no sólo se remite a este tipo de poblaciones; estudios realizados en Europa muestran que algunas regiones tienen tasas variables de incidencia de CaP. Los países del centro, este y sur del continente europeo se distinguen por tener tasas de incidencia, por cada 100,000 habitantes, menores a 78.7, destacándose Moldavia y Ucrania con incidencias del 23.3 y 27.7, respectivamente. El lado opuesto radica en los países del norte y noroeste europeos, donde las tasas de incidencia se incrementan dramáticamente a partir de los 122.6 casos por cada 100,000 habitantes siendo Irlanda el país con más alta incidencia de CaP en Europa con un valor de 183.1 (12).

Desafortunadamente, para nuestra población no hay un estudio que relacione las nuestras características étnicas con el CaP, recordando que somos producto del mestizaje con población española por lo que existe una enorme variabilidad genética entre los hombres mexicanos (13).

### **1.2.3 Factores Hormonales**

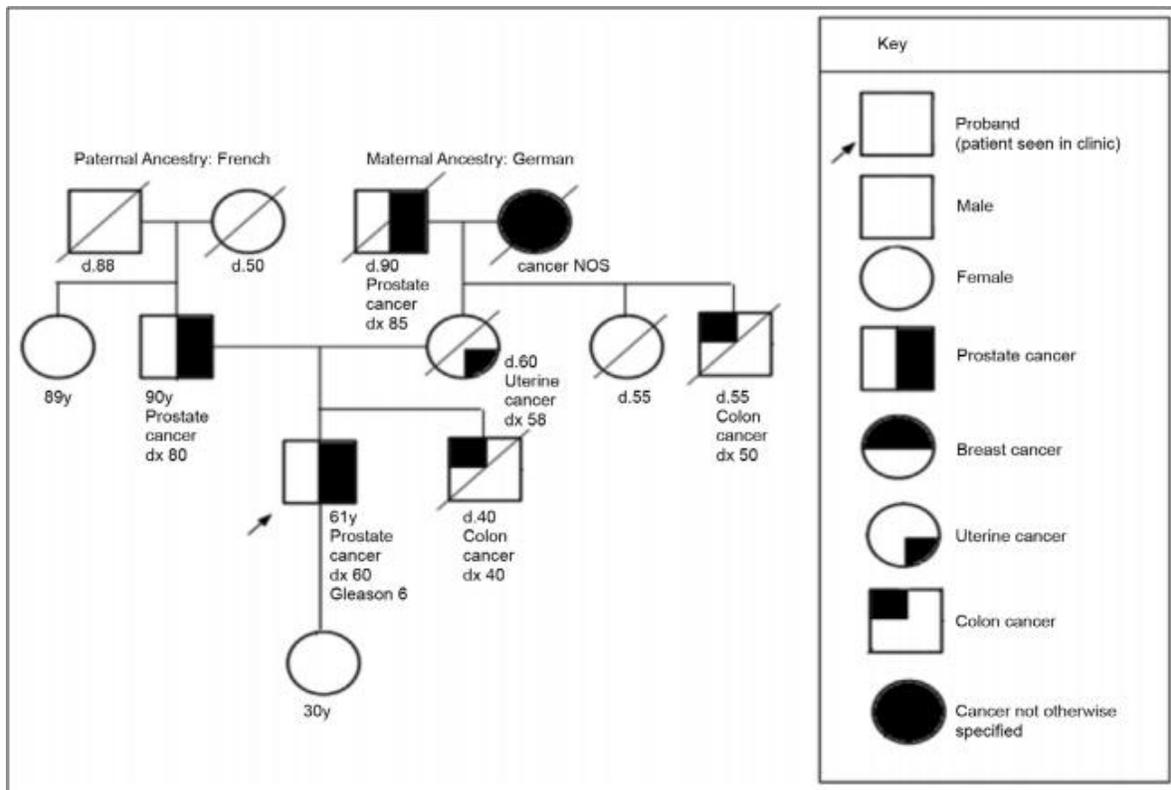
Los niveles hormonales en CaP son un punto a discusión entre los médicos urólogos, ya que hay bibliografía que apunta que elevados niveles de testosterona incrementan el riesgo de un crecimiento acelerado de la próstata, de manera inversa también se ha visto que tumores cuyos pacientes tienen bajos niveles de testosterona podrían estar implicados en el desarrollo de tumores más agresivos (14, 15).

#### 1.2.4 Factores genéticos

La asociación entre los factores genéticos y el CaP ha sido descrita con relación a su agresividad. Se sabe que existe una predisposición genética a padecer CaP en aquellos hombres portadores de mutaciones en genes implicados en la reparación del DNA. Esta predisposición está íntimamente relacionada con la aparición de CaP metastásico resistente a castración (mCRPC, por sus siglas en inglés), lo cual es un indicador del grado de severidad del tumor. Esto viene demostrado por un estudio dirigido por Pritchard y colaboradores (2016) en el cual secuenciaron el DNA de 692 pacientes con mCRPC provenientes del Reino Unido, los cuales documentaron registros de historial familiar de cáncer a la edad del diagnóstico. Los autores encontraron que el 11.8% de los pacientes (82/692) tuvieron al menos una mutación presente en alguno de los genes de reparación de DNA, sobresaliendo *BRCA2* (37 pacientes), *ATM* (11 pacientes), *CHEK2* (10 pacientes), *BRCA1* (6 pacientes), *RAD51D* (3 pacientes) y *PALB2* (3 pacientes) (16).

Mucci y colaboradores (2016) presentaron un interesante estudio para determinar el riesgo heredable de cáncer en general entre gemelos provenientes de población nórdica, encontrando para el de próstata una probabilidad de padecerlo del 57% (95% IC, rangos que van del 51%-63%). Además, los autores encontraron que para aquellos gemelos monocigotos (197 casos) y dicigotos (148 casos) el tiempo que transcurrió entre un diagnóstico y otro fue de 3.7 años y de 6.1 años (valor de  $p=0.008$ ), respectivamente (17).

En un estudio de consejo genético presentado por Giri y colaboradores, muestran el caso de un paciente de 61 años diagnosticado con CaP (Gleason 6) el cual presenta un historial familiar de distintos tipos de cáncer (probable síndrome de Lynch), tal y como se puede observar en la figura número 2.



**Figura 2. Árbol genealógico de un paciente con CaP.** Historial familiar de cánceres de próstata, útero, colón y otro no especificado; el paciente con ancestría paterna francesa y alemana por parte materna (18).

Existen además reportes de otros genes potencialmente involucrados en el desarrollo del CaP, los cuales serán abordados posteriormente en el punto 1.5 (Medicina de precisión y la ciencia translacional).

### **1.2.5 Factores ambientales y estilo de vida.**

Se han reportado diversos factores alrededor del estilo de vida de los hombres latinos que aportan un incremento en el desarrollo del cáncer; destacan entre ellos el contenido de grasa corporal, el consumo de alcohol y carnes rojas, los niveles séricos de calcio, licopenos y vitamina D (19).

Por otro lado, se ha considerado que la exposición a fuentes de xenobióticos tales como al humo proveniente de quema de leña o carbón, así como de combustibles asociados a actividades de granja promueven el desarrollo de distintos tipos de cáncer, siendo estas actividades englobadas como exposición a la biomasa (20). Además, se ha visto que el consumo de tabaco ocasiona un leve incremento en el desarrollo de CaP (21).

### **1.3 Métodos de diagnóstico del CaP**

Sin duda alguna la batalla contra el cáncer depende, en gran medida, del desarrollo de métodos de diagnóstico exactos y precisos, ya que con ello se pueden establecer oportunas campañas de tamizaje. Así, los sistemas de salud podrían establecer algoritmos de control que permitan tener una vigilancia activa para aquellos pacientes con un riesgo de padecer algún tumor.

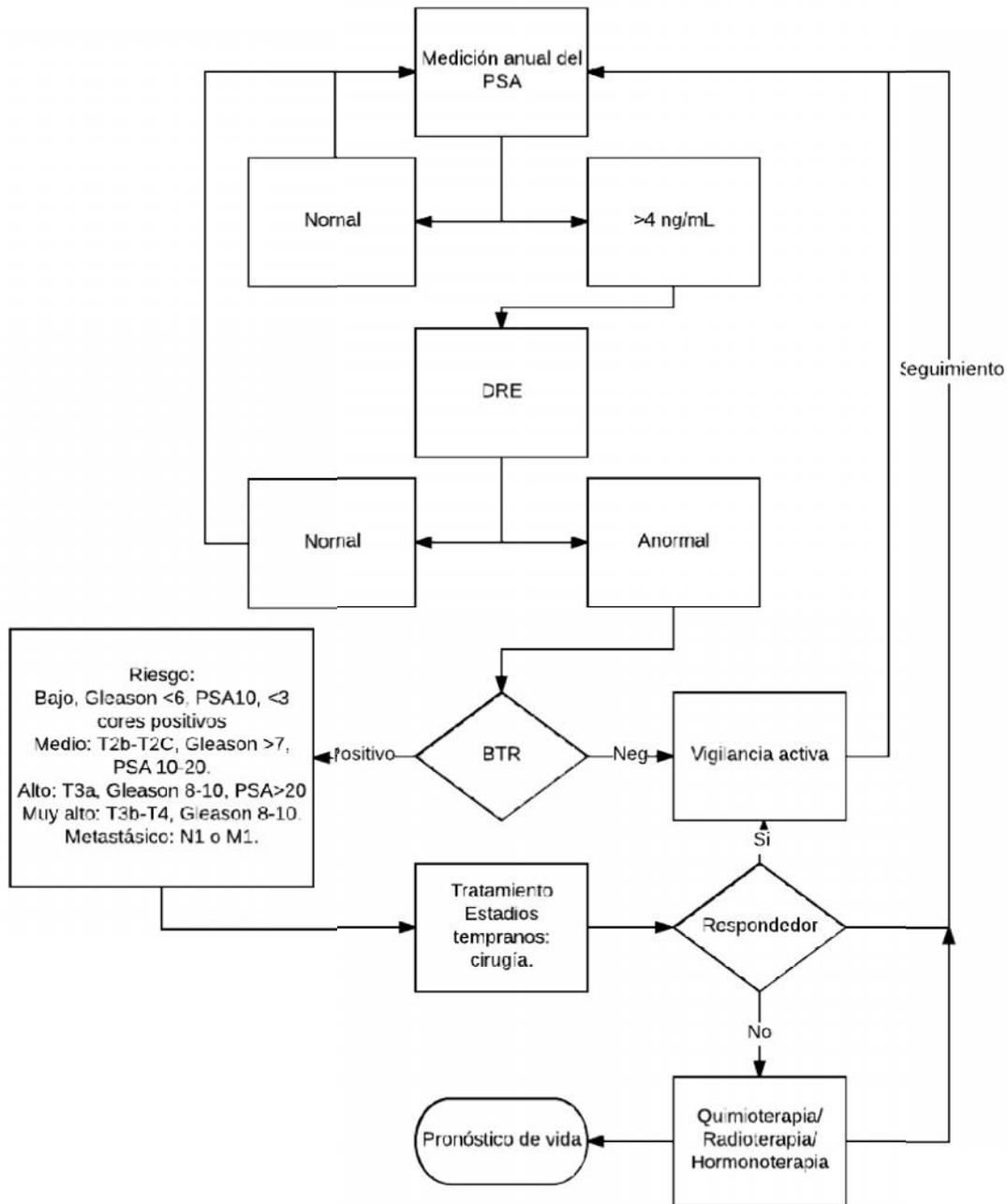
El CaP es una prioridad dentro de nuestro sistema de salud nacional, mejorando los actuales métodos disponibles en el mercado y con activos programas de vigilancia que permitiera tener monitoreados a los sujetos predispuestos a él. En este sentido, durante el año 2017 se aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-048-SSA2-2017, para la prevención, detección,

tratamiento, vigilancia epidemiológica y promoción de la salud sobre el crecimiento prostático benigno y el cáncer de próstata. Se espera que cada vez sean mayores las campañas preventivas para el CaP y que con ello puedan disminuir las cifras epidemiológicas detalladas previamente.

Los métodos que se ofrecen como diagnóstico y pronóstico de CaP son el antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés), el tacto dígito rectal (DRE, por sus siglas en inglés) y el ultrasonido transrectal, así como la biopsia transrectal para determinar si hay o no un tumor de próstata, siendo esta última el estándar de oro para el diagnóstico. Otro método, con alto costo, que actualmente promete afinar las biopsias prostáticas es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La figura número 3 muestra un diagrama de flujo general de cómo se maneja el CaP desde las cuestiones de tamizaje hasta los aspectos generales de tratamiento y seguimiento (22).

### **1.3.1 Antígeno prostático específico**

Las limitantes en los métodos de detección disponibles y la falta de pruebas con suficiente sensibilidad y especificidad, hicieron que distintos grupos de investigación buscarán biomarcadores para esta enfermedad. Hay que recordar que un biomarcador es un parámetro medible de laboratorio que refleja el curso fisiológico de una enfermedad (23).



**Figura 3. Esquema general desde el tamizaje hasta el manejo del paciente con CaP.** Nota: cores positivos se refiere al número de piezas biopsiadas a un paciente para determinar la presencia o no de cáncer.

La primera aplicación publicada para el PSA data de 1982, donde los investigadores buscaron su localización mediante pruebas de inmunoperoxidasa en casos de cánceres metastásicos de origen desconocido, con el objetivo de identificar aquellos en los que el CaP es el causante del tumor primario; los autores ya señalaban una fuerte correlación entre los valores de Gleason y la presencia (no cuantificable) de PSA (24).

El PSA es una enzima de 30 kDa derivada de la familia de la calicreína 3-peptidasa (*KLK3*). Bajo condiciones patológicas (no necesariamente cáncer), las células del epitelio prostático sintetizan PSA y lo liberan al medio extracelular (25). La tabla número 2 muestra los niveles aceptables de PSA en hombres sanos de distintos grupos de edad.

**Tabla 2. Comparación entre los valores normales de PSA de acuerdo a los grupos de edad comparados (26).**

<b>Grupo de edad (años)</b>	<b>Valor normal del PSA (ng/mL)</b>
30 – 49	0.6 – 0.78
50 – 59	0.7 – 1.23
60 – 64	1.2
65 – 69	1.43

Un estudio elaborado por Loeb y colaboradores (2006) analizó los valores de PSA de un total de 13,943 hombres, reclutados entre los años 1991 – 2001; el análisis realizado por los autores determinó que aquellos hombres menores de 60

años que tuvieran un PSA  $\geq 2.5$  ng/mL tuvieron un riesgo incrementado de padecer CaP con el paso de los años, por lo que valores por debajo del número que ellos determinaron se consideran normales para un hombre de estas edades (27)

Como se observa en la tabla 2, los valores de PSA comienzan a incrementarse a partir de la quinta década de la vida, por lo que es recomendable realizarse la detección del PSA cada dos años si el sujeto no tiene antecedente de algún factor de riesgo. En caso de tener antecedentes familiares de CaP, se recomienda iniciar su detección a partir de los 40 años.

Ahora bien, valdría la pena el análisis de qué tanto beneficio ha traído el tamizaje del CaP mediante el uso del PSA. Desde su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) en 1994, el PSA ha tenido un extenso uso en EUA ya que su objetivo primordial es el diagnóstico temprano del CaP (28).

El efecto inmediato del uso del PSA como método de tamizaje en EUA fue el sobrediagnóstico y el sobretratamiento frente al CaP, hecho que no ha venido a retribuir en una disminución en su mortalidad. En EUA, y contrario a lo que señalan otros trabajos, se considera un umbral normal para el PSA en un valor de 4 ng/mL (29).

Un estudio publicado por Center y colaboradores (2012) hizo un extenso análisis de la incidencia del CaP a lo largo de distintos países de los cinco continentes, lo más relevante del caso fue que en EUA el 42% de los CaP diagnosticados se debieron a la detección de los niveles altos de este biomarcador, mientras que en Europa sólo el 23% de los casos de CaP fueron

diagnosticados por la presencia del PSA. Otro dato relevante es que el PSA incrementó el diagnóstico de CaP, comparado con el DRE, en un valor del 81% en países Nórdicos, EUA, Canadá y Australia (países con altos índices de desarrollo) (30).

### **1.3.2 Tacto Dígit Rectal**

La práctica clínica de utilizar el DRE como prueba para la evaluación del tamaño prostático y su relación con la existencia del CaP es bastante antigua; Kauffman y colaboradores (1954) realizaron un estudio de 110 pacientes con CaP, siendo posible en 81 de ellos (74%) palpar una próstata anormal a través del DRE (31).

Un macro estudio realizado por Halpern y colaboradores (2016) que incluyó el tamizaje de 35,350 hombres durante el período de 1993 – 2001 y con un rango de edades entre los 55 – 74 años, se encontró que 3,265 (9.2%) tuvieron un DRE anormal y de ellos sólo 1,612 desarrollaron CaP, tomando en cuenta sólo aquellos hombres donde pudo ser detectado el tumor y ser relacionado con el resultado del DRE; sin embargo, los autores señalan que el DRE *per se* es capaz de detectar el CaP (32).

Isaa y colaboradores (2006) realizaron un estudio en pacientes norteamericanos referidos para biopsia prostática. Los autores realizaron el DRE y determinaron que el valor predictivo para CaP que emite un DRE anormal es altamente variable con rangos entre el 14% - 81%, dependiendo de las características de los pacientes analizados (33).

El DRE, además de sus ventajas en el diagnóstico y sus limitaciones clínicas (por contradictorio que parezca), tiene un problema en cuanto a su uso: los efectos psicológicos que le rondan como barrera en la inclusión de más hombres en los métodos de tamizaje para el CaP (34).

### **1.3.3 Biopsia prostática**

El estándar de oro para el diagnóstico de cualquier tipo de cáncer, es el análisis y correcta clasificación patológica de una biopsia de tejido, ya que con ella se puede establecer el grado de avance y, en algunos casos, la presencia de algún marcador celular que permita establecer una terapia farmacológica.

En el caso del CaP, la biopsia se hace tradicionalmente posterior al hallazgo de un elevamiento en el PSA, un DRE anormal, considerar la edad y algunos otros parámetros clínicos como la presencia de infecciones o bien factores heredofamiliares. Al paciente que es referido para la toma de una biopsia, se le administra una terapia profiláctica con antibióticos (generalmente ciprofloxacino) y se le aplica anestesia local, ya que la biopsia se realiza a través de punciones que atraviesan el recto (bien llamada biopsia transrectal o BTR) y se toman de 10 a 14 *cores* (puntos anatómicos de la toma de la muestra; en nuestro Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” se toman 12 *cores*) en área predefinidas en la periferia de la glándula, todo ello guiado por un ultrasonido transrectal. Hoy en día, la medicina está apoyándose en el uso de resonancia magnética multiparamétrica para la toma de biopsias guiadas, siendo posible encontrar sitios bien definidos con lesiones y a partir de ellas tomar la biopsia

prostática, se piensa que con ello pudieran disminuir el número de *cores* que se toman para la realización del estudio (29). Una vez realizada la toma de estas biopsias, el proceso que se sigue es su inclusión en parafina para el análisis por patólogos expertos que observan el grado de diferenciación celular y emiten un diagnóstico a través de su clasificación histológica y escala Gleason, así como el porcentaje de *cores* positivos para dicho diagnóstico.

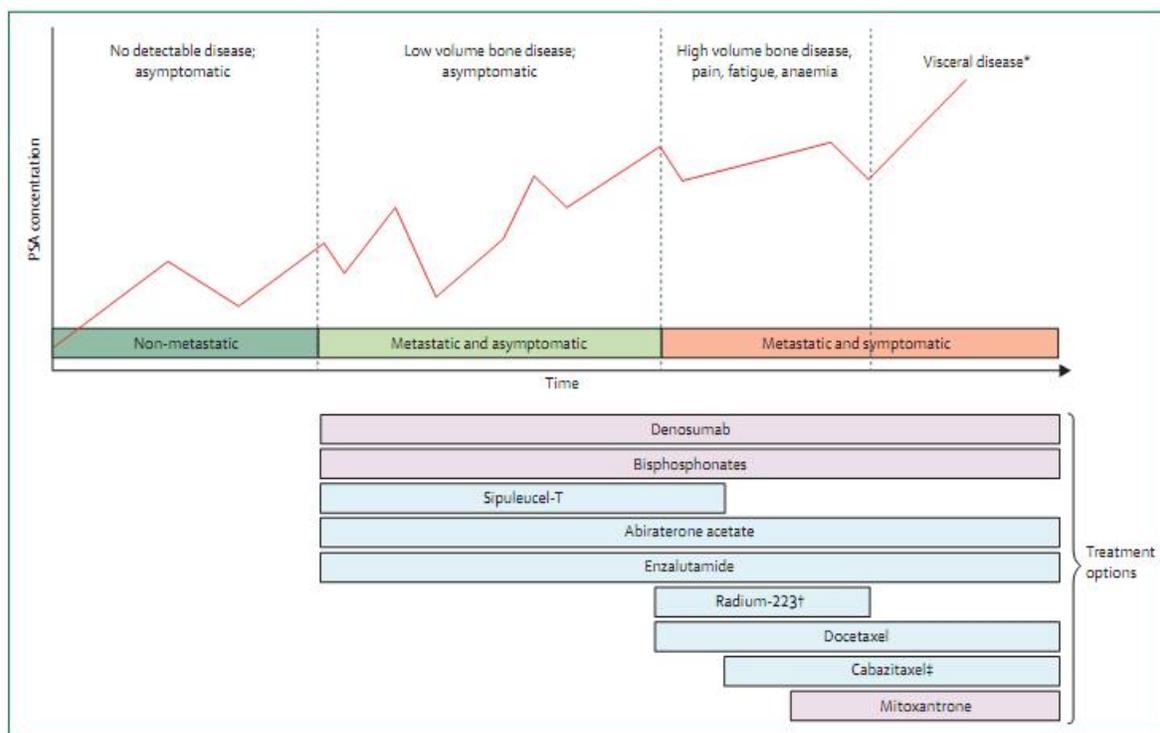
#### **1.4 Manejo y decisiones clínicas para el tratamiento del CaP**

La práctica clínica encuentra en el CaP un tumor, en general, de lenta progresión, con escasa sintomatología que alerte a los hombres de su presencia. Los médicos urólogos basan los tratamientos contra el CaP de acuerdo a las guías provistas por el National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®) (22).

En primer punto, el manejo terapéutico contra el CaP se realiza estratificando a los pacientes en grupos de riesgo, los cuales dependen del estadio clínico T, el DRE, estudios de radio imagen, niveles de PSA y por supuesto el valor Gleason del tumor. Los enfoques de este manejo incluyen a la cirugía, radioterapia, la vigilancia activa (con intervención quimioterapéutica si el cáncer progresa), observación del paciente (monitoreo de la enfermedad y terapia paliativa) y terapia de deprivación androgénica (ADT, por sus siglas en inglés).

El objetivo principal de todo tratamiento contra el cáncer es lograr la remisión clínica de los pacientes, asumiendo una respuesta favorable del tratamiento que evite su evolución a un estado metastásico; sin duda la respuesta favorable depende de las características moleculares del tumor que afecte a los

pacientes. En la figura 4, Lorente y colaboradores muestran los hechos ocurrientes típicos en el desarrollo de mCRPC; los autores han catalogado la enfermedad en tres fases: 1) no metastásica, asintomática y no detectable; 2) metastásica, asintomática y con baja progresión a hueso; y 3) metastásica, sintomática con la progresión a hueso o a vísceras

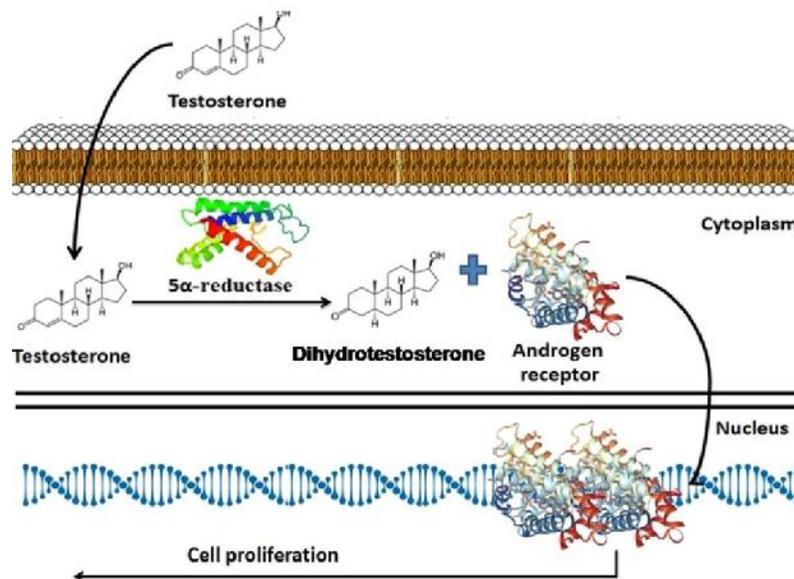


**Figura 4. Progresión típica de un cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.** En esta figura pueden observarse las tres fases típicas de este nivel de progresión, así como las opciones existentes de tratamiento para estos pacientes (35).

El mCRPC es definido como una forma severa y resistente a las terapias hormonales del CaP, posterior a deprivación androgénica ya sea química o quirúrgica, donde se presenta una elevación considerable en los niveles de PSA (36). El tratamiento es más bien paliativo, ya que hay pocas expectativas de cura.

Hay pocos estudios que muestren la epidemiología del mCRPC. Hirst y colaboradores (2012) realizaron un estudio en el Reino Unido, evaluando la epidemiología del mCRPC; los autores identificaron en una población de 11,600 casos de pacientes con castración, que 3277 pacientes (28%) desarrollaron mCRPC (37).

Sin embargo, para tener una mejor comprensión de estos mecanismos de resistencia terapéutica, es necesario revisar cómo son las rutas de crecimiento celular en la próstata. Estas rutas dependen enteramente de la disposición de andrógenos, principalmente testosterona para su proliferación (38, 39). La figura número 5 muestra un bosquejo simplificado de la ruta de acción de los andrógenos.



**Figura 5. Mecanismo general de acción de andrógenos (Axi del receptor de andrógenos).** Imagen propia.

También conocido como el axis del receptor de andrógenos (AR), esta ruta inicia cuando la testosterona libre llega a las células prostáticas y entra a las mismas a través de procesos de difusión de membrana. Una vez dentro, es convertida en dihidrotestosterona (DHT) a través de la enzima esteroidea 5 alpha-reductasa 2 (40-42). La DHT es el metabolito activo a través del cual inicia la cascada de señalización del AR. El complejo formado entre DHT-AR se dimeriza con otra molécula igual e inician su viaje hacia el núcleo celular, en donde mediante los dominios de unión a DNA del AR se inicia un cambio en la expresión génica que permite la proliferación y supervivencia celular, así como la expresión de proteínas tales como el PSA (40).

Algunas variantes sobre la secuencia genómica del gen *SRD5A2* confieren el efecto de alterar la actividad catalítica de la enzima esteroidea 5 alpha-reductase 2, lo cual tiene el potencial de propiciar el desarrollo de CaP (43-46). En este contexto, se han estudiado algunas variantes con este efecto, tales como las repeticiones de los dinucleótidos TA en la región 3'-UTR de la secuencia del mensajero (47, 48), rs9332964 (49, 50), rs928258 (44) and rs523349 (51, 52). Las variantes rs928258 y rs523349 han sido tamizadas en distintos grupos étnicos, observándose efectos diferentes.

La variante rs9282858 (p.Ala49Thr o A49T) resulta de la sustitución de un sólo nucleótido, una G por una A (GCC/ACC), causand un cambio aminoacídico de una alanina por una treonina. Se ha reportado que este cambio incrementa la actividad enzimática en 5 órdenes de magnitud (49, 53). La base de datos ENSEMBL reporta esta variante como a) benigna en ClinVar, b) deleterea en

SIFT, c) benigna en PolyPhen, y d) altamente benigna en CADD([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580256-31581256;v=rs9282858;vdb=variation;vf=57248637](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580256-31581256;v=rs9282858;vdb=variation;vf=57248637)).

La variante rs9282858 (p.Ala49Thr o A49T) resulta de la sustitución de un sólo nucleótido, una G por una A (GCC/ACC), causando un cambio aminoacídico de una alanina por una treonina. Se ha reportado que este cambio incrementa la actividad enzimática en 5 órdenes de magnitud (49, 53). La base de datos ENSEMBL reporta esta variante como a) benigna en ClinVar, b) deleterea en SIFT, c) benigna en PolyPhen, y d) altamente benigna en CADD ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580256-31581256;v=rs9282858;vdb=variation;vf=57248637](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580256-31581256;v=rs9282858;vdb=variation;vf=57248637)).

Por otro lado, la variante rs523349 (p.Val89Leu o V89L) resulta de la sustitución de un solo nucleótido, una C por una G (CTA/GTA), causando el cambio aminoacídico de una valina por una leucina. Se ha reportado que este cambio de aminoácido influye en una reducción de la actividad enzimática del 30% (49, 51, 54). En el mismo sentido, la base de datos ENSEMBL reporta esta variante como a) benigna en ClinVar, b) sustitución tolerada en SIFT, c) benigna en PolyPhen, y d) probablemente benigna en CADD ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580136-31581136;v=rs523349;vdb=variation;vf=54157055](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=2:31580136-31581136;v=rs523349;vdb=variation;vf=54157055)).

Al igual que otras enfermedades, los hallazgos moleculares encontrados en poblaciones de descendientes Europeos no pueden asumirse iguales para otros

grupos étnicos. En vías implementar un modelo de medicina de precisión, es necesario llevar a cabo estudios de genotipificación de variantes en los grupos étnicos de interés, ya que hasta la fecha los datos de poblaciones no Europeas siguen siendo escasos (55).

La población Mexicana es genéticamente diversa (56); por lo tanto, es necesario un estudio más detallado de la estructura geográfica de la población que permita conocer la frecuencia y prevalencia de las enfermedades fenéticas de las poblaciones nativas y mestiza de México (13, 56, 57). En enfermedades como el CaP, esta información podría ser de utilidad para su diagnóstico, pronóstico y tratamiento (13, 56).

En nuestro país, se han llevado a cabo estudios previos de tamizaje de variantes genéticas; sin embargo, estos estudios se han limitado a la búsqueda de variantes sobre los genes *AR*, *VDR* (58), *VEGF* (59), *ATP6*, y *ND3* (60).

### **1.5 Medicina de precisión y la ciencia translacional**

La medicina actual y las nuevas tecnologías genómicas están en constante evolución; la conclusión del Proyecto del Genoma Humano (PGH) trajo consigo una revolución en el conocimiento de la genética de un sinnúmero de enfermedades y con ellos mejoras continuas en los métodos de diagnóstico y de tratamiento de los pacientes (61).

Hasta hace algunos años se creía que sólo un porcentaje del DNA humano era funcional, es decir que es traducible en alguna proteína que desempeña una función celular a nivel local o a distancia, esto se creía así hasta la publicación del

proyecto ENCODE, en donde se demostró que aquel 80% del DNA que se creía basura, en realidad guarda funciones a nivel celular, las cuales pueden comprenderse como funciones regulatorias de la expresión génica o bien de mantenimiento y correcto funcionamiento de la estructura genómica (62). La traducción de esta enorme y compleja biblioteca de información génica recae en una futura y posible asociación de un buen número de enfermedades complejas, como aquellas autoinmunes, la diabetes mellitus o el cáncer.

Los hechos pasados desde el PGH, ENCODE, HapMap o el proyecto de los 1000 genomas muestran la notable necesidad de llevar los resultados de laboratorio a la práctica médica, que a la vez permitirá afinar los tratamientos existentes de la salud humana.

El conocimiento de los perfiles de los cambios en la estructura y de la expresión génica de los diferentes tipos tumorales, es un área de investigación que ya tiene buen recorrido. Cánceres como los de mama, cérvico uterino, ovario o pulmón han develado una buena parte de sus estados de estructura y de expresión génica (63-66).

Por su parte, el CaP no cuenta con un estudio donde se busque específicamente el paisaje genómico de este tumor, más bien es una revisión de la literatura científica. Publicado en 2013 por Barbieri y colaboradores, se señala que a diferencia de otros tumores, el CaP posee una alta heterogeneidad entre los eventos somáticos que inciden sobre él (67). Sin embargo, los autores señalan

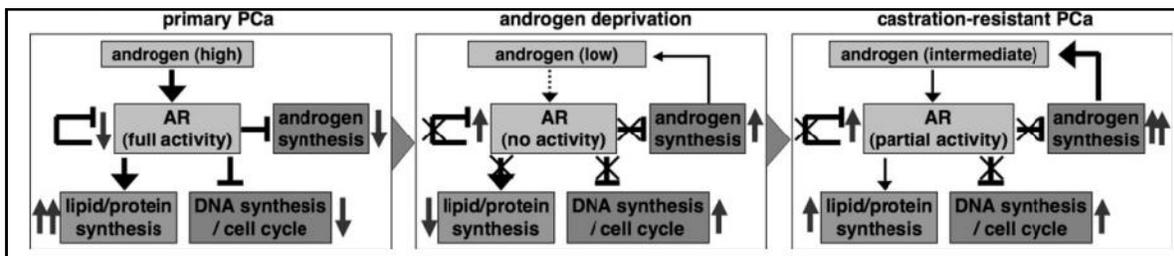
que existen algunas características moleculares bien definidas en la literatura que fue revisada:

- *TP53*: Ecke y colaboradores (2010) encontraron una frecuencia de mutaciones en este gen en un 35.6% de los casos (32/90 pacientes), siendo los principales sitios mutados los exones 5, 7 y 8 resultando los dos últimos como factores de progresión tumoral (68).
- *PTEN*: Se ha establecido la pérdida de la función de este gen a causa de deleciones homocigotas o bien haploinsuficiencia ocasionada por deleciones heterocigotas; se sabe que el 70% de los CaP primarios aun no tienen la pérdida de ambos alelos de este gen; sin embargo, entre el 10 – 50% de los mCRPC tienen la pérdida de este gen. Además, en casos avanzados donde no hay eventos en la estructura genética de *PTEN*, se ha visto un decremento en la función de la proteína expresada (37% - 45% de los casos), por lo que otros sucesos a nivel del DNA (metilación) o del RNA (presencia de miRNAs o lncRNA) pudieran estar afectando (69).
- *TMPRSS2-ERG*: La fusión entre el gen *ERG* con una fracción del extremo 5´ del gen *AR* a causa del rearrreglo genómico ocasionado por la deleción *TMPRSS2* ha sido propuesta como un biomarcador de progresión tumoral (70-72).
- *SPOP*: La aparición de eventos genómicos en este gen se ha reportado en al menos el 10% de los CaP; *SPOP* ocasiona inestabilidad genómica en el CaP y su particular participación en su tumorigénesis radica en ser activador de *BRCA1*, por lo que su afectación estaría implicando el

compromiso en la función reparadora que guarda la vía de la recombinación homóloga (73).

- *CDH1*: Liu y colaboradores (2014) analizaron la expresión de *CDH1*, proteína conocida como E – cadherina. Los investigadores encontraron una expresión estadísticamente significativa de esta proteína en biopsias de archivos de patología revisadas de 90 pacientes de población china, encontrándola en el 66.7% de los casos de CaP avanzados. Este marcador proporciona idea acerca de la invasividad tumoral que pudiera tener el CaP en los pacientes analizados y que podría ser utilizado con marcador de metástasis (74, 75).
- Rearreglos *ETS*. La familia *ETS* pertenece a una serie de genes que codifican factores de transcripción, los cuales funcionan a manera de “switch” para la activación de la vía metabólica RAS/ERK y el control de la actividad de PI3K/AKT, todas estas regulaciones génicas se traducen en una progresión celular en al menos la mitad de los CaP y propone una posible explicación a la aparición de aberraciones ocurridas sobre el gen *PTEN* (76, 77).
- Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA): Esta es una proteína del tipo de las glicoproteínas transmembrana de tipo II y es codificada por el gen de la Folato Hidrolasa I (*FOLH1*). Se ha visto un nivel incrementado en su expresión en CaP con un uso extendido para la determinación de metástasis tumorales a través de estudios de imagenología (78)

- Receptor de Andr6genos (AR): La inhibici6n del AR es uno de los blancos terap6uticos m1s utilizados en el tratamiento del CaP, ya sea la deprivaci6n androg6nica a trav6s de la prostatectom1a radical o bien con el uso de agentes bloqueadores de esta v1a hormonal. Cai y colaboradores (2011) mencionan que el AR juega un papel importante en la progresi6n del CaP a mCRPC, en la figura 6, tomada de la propuesta hecha por los autores se1alan el rol que juega el RA – niveles de andr6genos en la progresi6n del ciclo celular y la importancia que guarda en el mCRPC (79).



**Figura 6. Rol del AR en la progresi6n del ciclo celular a trav6s de las distintas etapas del CaP.**

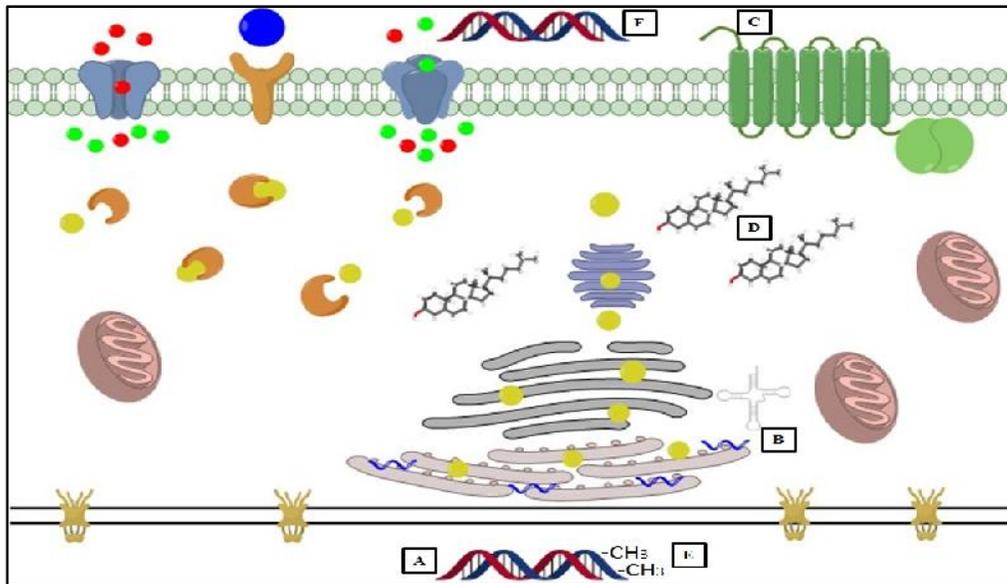
En ausencia de CaP, el AR cuenta con un represor que reduce su actividad frente a una alta concentraci6n de andr6genos (principalmente testosterona y DHT). Cuando se suprime la exposici6n endocrina del AR se espera que se detenga el crecimiento celular y con ellos la progresi6n del tumor; sin embargo, algunas c6lulas del CaP que se encuentran bajo tratamiento tienen la capacidad de reprogramarse y comenzar una estimulaci6n autocrina del AR, que a su vez tiene una actividad de factor de transcripci6n, y con ellos volver a instaurar una proliferaci6n celular. Al llegar a este punto, el CaP pasa a convertirse de un CaP

sensible a la privación hormonal a un mCRPC y con ello se tienen pronósticos muy reservados de los pacientes que lo sufren (80).

Como pudimos constatar, son pocos, pero bien definidos algunos de los factores que predisponen a los pacientes al mCRPC, y por tanto deben estar monitoreando constantemente pues es la forma más severa y de peor pronóstico del CaP.

Ahora bien, existen limitaciones importantes en los estudios que se han encargado de determinar las características clínicas y moleculares de la enfermedad. Estas características moleculares han sido determinadas a partir de muestras de los archivos de patología o análisis de muestras frescas tomadas a los pacientes y, aunque ha habido significativos avances en cuanto a posibles blancos terapéuticos, no ha habido avances respecto a la disponibilidad de una buena muestra para la búsqueda de estas firmas genéticas de manera rápida.

Recientemente se ha explorado uso de biopsias líquidas para la detección de biomarcadores circulantes de un buen número de enfermedades; sin embargo, la investigación en los tejidos sigue siendo el estándar de oro de estudio ya que permite encontrar una serie de moléculas informativas que son blanco de las ciencias ómicas, tal y como se observa en la figura 7, mismas que pueden ser encontradas en la biopsia líquida (81).



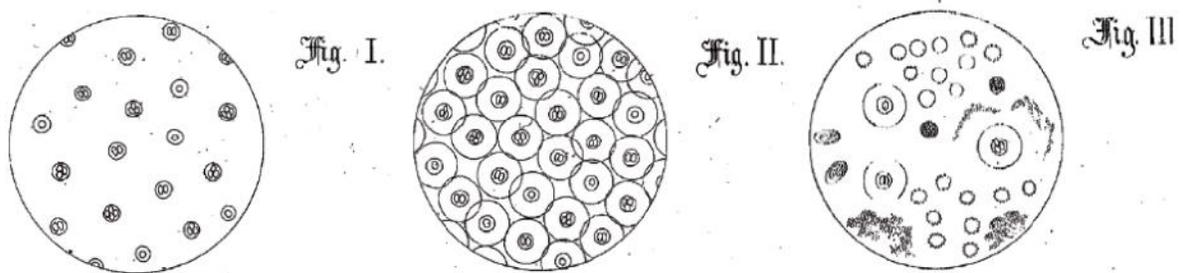
**Figura 7. Blancos de estudio de las ciencias ómicas.** A) DNA nuclear y F) DNA circulante para la genómica; B) RNAs para transcriptómica; C) proteínas para la proteómica; D) metabolitos para la metabolómica; y E) metilación para la epigenética.

### 1.6 Biopsias líquidas y el rastreo de Células Tumorales Circulantes.

Entendemos por biopsia líquida como aquella fuente de biomarcadores con origen en fluidos corporales como sangre, saliva, orina o una efusión pleural. Éstas tienen como característica primordial contener la misma información que la biopsia de tejido, en nuestro caso, tumoral. Esto representa una enorme y muy valiosa ventaja ya que con una biopsia líquida, además de hacer un diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, sería posible trazar en tiempo real la dinámica tumoral de la enfermedad (82, 83). Sin embargo, la actual problemática estriba en determinar las características moleculares rastreables en la biopsia líquida.

La ciencia ha puesto innumerables esfuerzos en encontrar proteínas biomarcadoras en las distintas biopsias líquidas. Sin embargo, los nuevos métodos de secuenciación nucleotídica proporcionan exquisitos valores de sensibilidad y especificidad para encontrar biomoléculas en concentraciones relativamente bajas. Los nuevos blancos de estudio en las biopsias líquidas son principalmente Células Tumorales Circulantes (CTCs) y DNA tumoral circulante (ctDNA, por sus siglas en inglés)(82, 84).

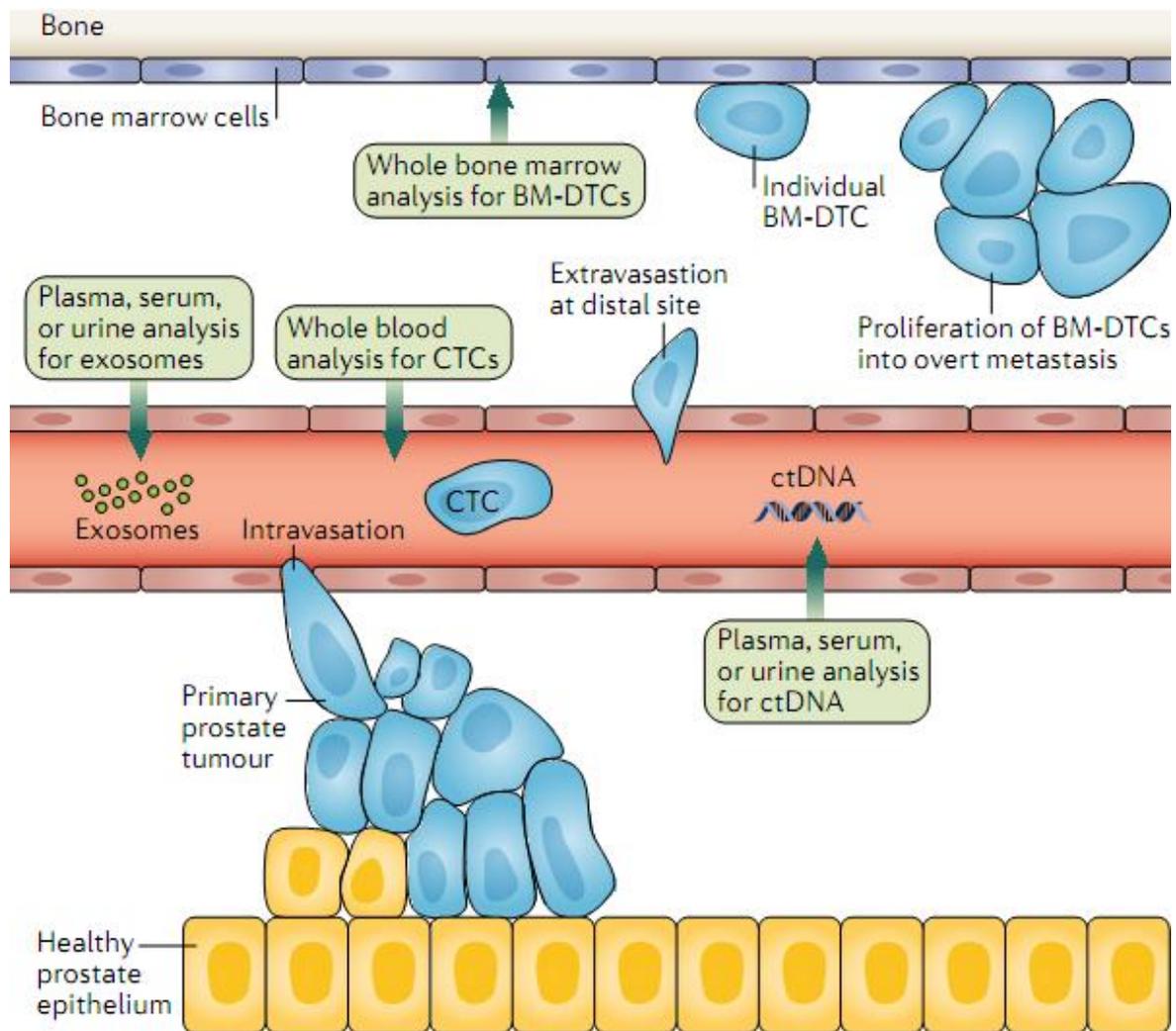
La primera descripción en la literatura científica de la aparición de CTCs en sangre de un paciente con cáncer, datan de 1869 cuando Thomas Ashworth describió la observación de células distintas a las hemáticas y con una morfología similar a las encontradas en el tejido tumoral (85). La figura 8 muestra las observaciones realizadas por el Dr. Ashworth.



**Figura 8. Primera observación de CTCs.** Muestra de sangre *post-mortem* de un paciente con cáncer en donde se describieron por primera vez las CTCs (86).

Hoy en día las CTCs se definen como células que sufren intravasación desde el sitio de crecimiento tumoral y que son liberadas hacia el torrente sanguíneo y linfático, siendo las responsables de ocasionar el desarrollo de las metástasis a distancia.

La figura 9 muestra gráficamente como estas células se desprenden desde el sitio de crecimiento tumoral e inician su viaje hacia otras partes del organismo.



**Figura 9. Biopsia líquida en cáncer.** Se observan los distintos analitos que pueden derivarse de una biopsia líquida. Entre ellos se encuentran CTCs, ctDNA y exosomas (87).

Estas células se encuentran en una proporción de entre 100 CTCs y 1000 CTCs por litro de sangre; comparado con este número, guardan una proporción sumamente baja con respecto al resto de los componentes sanguíneos que suelen

ser encontrados en órdenes de 1 CTC por cada mL de sangre o bien 1 CTC por cada millón de leucocitos y por cada billón de eritrocitos (88).

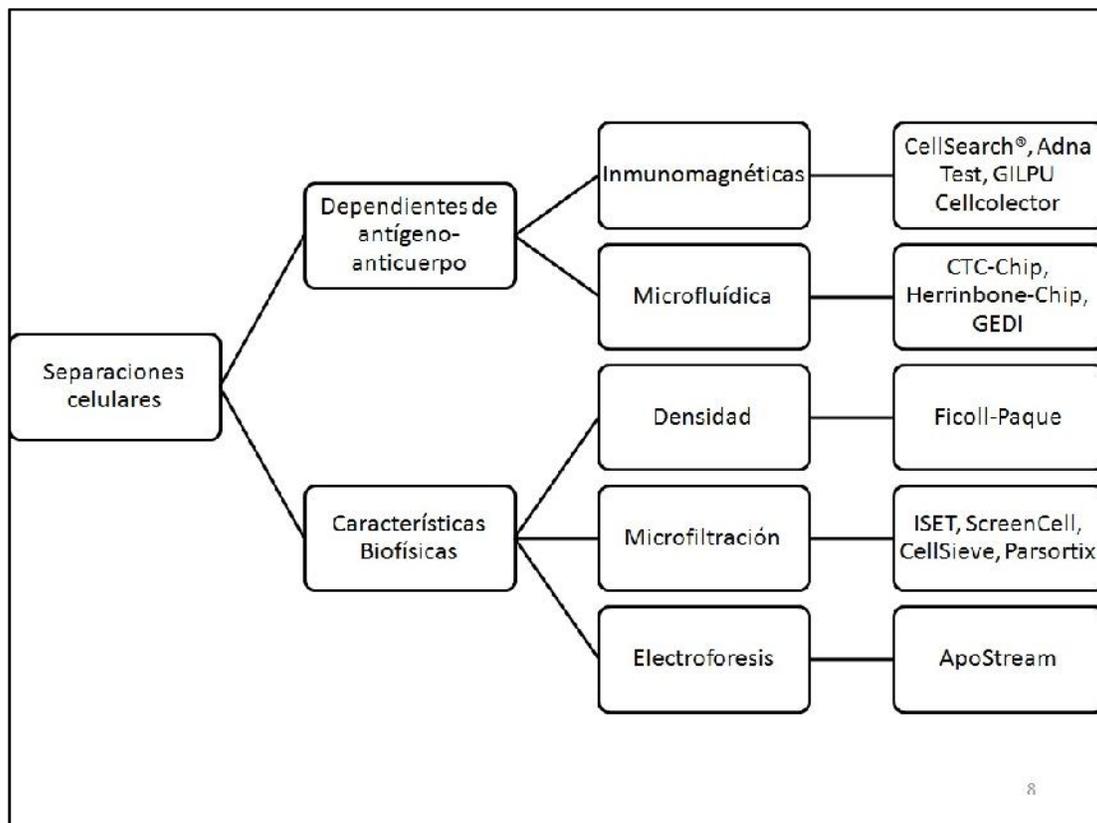
Debido a la proporción en la que las CTCs son encontradas, el reto de aislarlas y cuantificarlas a partir de una muestra de sangre es sumamente grande. Al día de hoy, solamente una tecnología ha recibido la aprobación de la FDA para su uso clínico en el pronóstico de pacientes con cáncer de mama, próstata y colon (89). Esta tecnología es conocida como CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italia) y define a las células tumorales por sus propiedades proteicas como **células nucleadas** que expresan la *Epithelial Cellular Adhesion Molecule (EpCAM+)*, citoqueratinas 8, 18 y 19 (**CK8+**, **CK18+**, **CK19+**) y negativas a la expresión del *Cluster of Differentiation 45 (CD45-)* y que además guardan una relación núcleo citoplasma mayor al 60% (90, 91).

El CellSearch® realiza el enriquecimiento de las CTCs (92) a partir de una muestra estándar de 7.5 mL, la cual es colectada en tubos propios conocidos como *CellSave Tubes*, los cuales contienen una solución preservadora (no hay datos de su composición, posiblemente debido a secreto industrial). La muestra es colectada por venopunción, usualmente de la vena cefálica accesoria, y esta puede ser procesada hasta 96 horas posteriores a la recolección.

Posterior a la colecta, se realiza un inmunoenriquecimiento de la muestra, a través de una separación con el uso de perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos dirigidos anti-EpCAM de tal forma que son retenidas aquellas células de estirpe epitelial. Posteriormente, las células son fijadas y teñidas con

anticuerpos anti-CK8, anti-CK18, anti-CK19 y anti-CD45. Finalmente, las células resultantes son observadas e identificadas por un sistema de imagen especializado propio del equipo y se clasifican como CTCs bajo la definición mostrada previamente (93).

Sin embargo, el uso de esta tecnología implica algunas limitaciones importantes para el estudio integral de las CTCs. Es por ello, que se han desarrollado múltiples plataformas con diferentes enfoques para el enriquecimiento de muestras, aislamiento de CTC, enumeración, cultivo y caracterizaciones moleculares. La figura 10 muestra los fundamentos generales y algunos ejemplos de tecnologías de separación de CTCs.



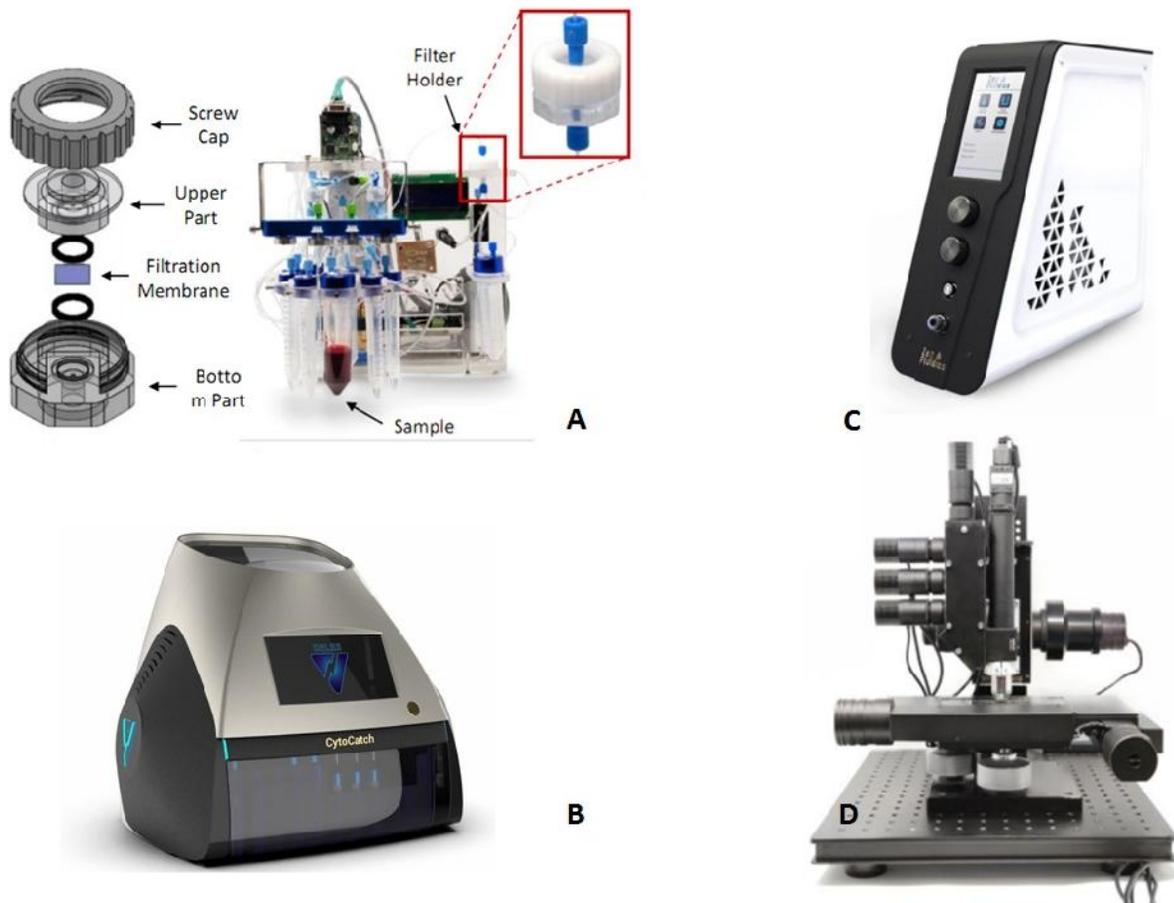
**Figura 10. Fundamentos de tecnologías de separación de CTCs (94, 95).**

Sin embargo, una de las principales limitantes del uso de los dispositivos para el aislamiento de CTCs es la cantidad de células a detectar, el volumen de muestra mínimo necesario, el estadio clínico del paciente, la escasa posibilidad de aislar células viables para su estudio y los componentes periféricos externos necesarios para su aplicación. A pesar de ello, los laboratorios de investigación - con la suficiente cantidad de recursos económicos y de infraestructura - siguen en el desarrollo de metodologías analíticas para la utilización de los mismos (96).

Es por ello que en este trabajo nos enfocamos a dos vertientes de estudio en el área de CaP. Por un lado, realizamos la estandarización de un nuevo dispositivo automatizado para el aislamiento, enumeración y caracterización de CTCs, así como el desarrollo de una prueba de concepto que muestre el potencial de esta plataforma para el estudio de las características moleculares de las CTCs y finalmente el análisis de un par de variantes genéticas asociadas al desarrollo de riesgo y protección contra CaP.

La plataforma de separación de CTCs que utilizaremos es conocida como Cytocatch™ (Delee Corp, Mountain View CA, USA). Esta plataforma basa el fundamento de la separación en el principio de tamaño y deformabilidad de las CTCs (97); el enriquecimiento de las muestras se realiza mediante el uso de una membrana de filtración elaborada por electroformado de níquel la cual está colocada en un holder a través del que existe una conexión de entrada para las muestras y una salida que a su vez se interconecta con un sensor de flujo y una unidad microcontroladora de alta precisión Zenfluidics™ (Delee Corp, Mountain View CA, USA) que maneja las velocidades de flujo y finalmente la muestra es

inmunoteñida *in situ* para luego ser transferida a un sistema de microscopia de alta resolución mediante el cual se identifican las CTCs a través de un algoritmo educado por inteligencia artificial (98, 99). La figura 11 muestra los componentes del sistema Cytocatch™.



**Figura 11. Componentes del nuevo dispositivo Cytocatch™:** A) Holder que contiene la membrana de filtración y vista general de los componentes del equipo de separación; B) Render de la integración de componentes del dispositivo de filtración; C) Unidad microcontroladora de alta precisión; D) Microscopio de alta resolución automatizado con rutina de autoenfoco (Delee Corp, Mountain View, CA, USA).

## Capítulo 2

### 2. Justificación.

El CaP es una de las enfermedades tumorales más importantes a nivel mundial, esto constituye un problema de salud pública nacional ya que ocupa primer lugar nacional en incidencia y mortalidad por cáncer entre la población masculina. Es por ello que requiere una fuerte atención multidisciplinaria que genere nuevos enfoques de atención clínica y básica para su diagnóstico y tratamiento.

En años recientes, el uso de biopsias líquidas ha traído consigo el hallazgo de grandes cantidades de información en “tiempo real” del estatus de progresión tumoral. Esto ha servido para sentar las bases de diagnósticos precisos en etapas tempranas y tratamientos basados en las características moleculares de los pacientes.

Uno de los enfoques del uso de biopsias líquidas, es el estudio de las CTC. Se sabe que estas células juegan un rol importante en el desarrollo de las metástasis tumorales, por lo que su estudio representa una opción atractiva para encontrar diagnósticos en etapas más tempranas de la enfermedad y optimizar los tratamientos de los pacientes.

A la fecha, solamente existe una tecnología con el aval de FDA para la enumeración de CTCs de CaP y solamente atañe el pronóstico de la enfermedad. Esta tecnología, conocida como CellSearch, cuenta con limitaciones en el método de separación de células, ya que involucra la expresión de EpCAM.

Debido a esto, diferentes grupos de investigación han desarrollado tecnologías de separación de CTC basadas en conceptos de microfluídica, inmunomagnetismo, dielectroforesis, acustoforesis y separaciones basadas por tamaño/deformabilidad de las células, todas ellas con el objetivo de tener altas eficiencias de captura y metodologías sencillas que permitan el estudio de estas CTC.

Es por ello, que en la presente tesis abordamos la caracterización de una metodología de separación de CTC basada en el tamaño y deformabilidad de las células, así como su implementación en una prueba piloto para la cuantificación y análisis de CTC de pacientes con CaP. Este estudio aborda un enfoque multidisciplinario en búsqueda de una técnica que permita el conteo de CTCs de pacientes con CaP y que a su vez permita el potencial análisis molecular de las mismas para abarcar diferentes ramas de la atención clínica de estos pacientes.

Además, se pretende realizar la identificación de biomarcadores polimórficos en un gen clave de la principal ruta de señalización celular del CaP, tal como lo es el gen *SRD5A2* en nuestra población mexicana.

Por otro lado, pretendemos con ello instaurar el uso de biopsias líquidas, en un primer punto como metodología de investigación para que los pacientes sean atendidos de manera integral y reciban tratamientos apegados a las características moleculares de los tumores de próstata que enfrenten.

## Capítulo 3

### 3. Objetivos.

#### 3.1 Objetivo General.

Implementar una prueba piloto de biopsia líquida para la detección de CTCs de pacientes con CaP e identificar potenciales biomarcadores del tipo polimórficos propios de población mexicana.

#### 3.2 Objetivos específicos.

Realizar la caracterización de una plataforma de detección de células tumorales de CaP utilizando una plataforma de microfiltración. (Fase in vitro).

- a. Caracterizar un sistema de imagen de microscopía para el reconocimiento de CTCs.
  - b. Caracterizar el protocolo de microfiltración para la separación y análisis de CTCs de pacientes con CaP.
2. Implementar un protocolo clínico piloto para la detección de células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de próstata (fase in vivo).
  3. En una cohorte de pacientes y sujetos sin enfermedad tumoral, determinar las frecuencias alélicas de las variantes A49T y V89L del 5 alpha-reductasa y sus potenciales implicaciones clínicas

## Capítulo 4

### 4. Materiales y métodos.

#### 4.1 Autorización del Comité de Ética en Investigación.

El presente proyecto fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, bajo el número de registro BI16-0007.

Dado que nuestro proyecto abarca una perspectiva multidisciplinaria e integral en el campo de biomarcadores de CaP, la metodología fue descrita para cada uno de los procedimientos experimentales realizados.

#### **4.2 Metodología objetivo 1: Realizar la caracterización de una plataforma de detección de células tumorales de cáncer de próstata utilizando una plataforma de microfiltración. (Fase in vitro).**

La realización de este objetivo tiene como fin encontrar las mejores condiciones para la realización de una prueba de laboratorio que permita la detección de células tumorales circulantes. Cabe recordar que la concepción de este proyecto de tesis persigue fines multidisciplinarios que van desde la construcción de un dispositivo médico para la aplicación en la detección de CTC, en nuestro caso, de pacientes con CaP.

Es por ello que en esta parte del proyecto, nuestros resultados esperados están orientados a determinar valores de eficiencia de captura, pureza, viabilidad celular y determinar si existe diferencia entre el aislamiento de diferentes líneas celulares.

#### **4.2.1 Cultivo celular de líneas tumorales de próstata**

Para la realización de este objetivo se utilizaron líneas celulares humanas de cáncer de próstata provenientes de la ATCC (Manassas, Virginia, USA): PC-3 (CRL-1435TM), LNCaP clona FGC (CRL-1740TM), DU-145 (HTB-81TM), y VCaP (CRL-2876TM) Las líneas celulares fueron cultivadas utilizando los medios de cultivo F-12K, RPMI-1640, EMEM, y DMEM provenientes de la misma casa comercial, respectivamente. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino (FBS) al 10% de la misma casa comercial. La razón de la elección de estos medios de cultivo y este tratamiento utilizando estas marcas fue por instrucciones del fabricante de cada de una de nuestras líneas celulares, ya que en el caso de CaP son de lento crecimiento. Los cultivos fueron realizados en incubadoras a 37° C en una atmósfera aireada al 5% de CO<sub>2</sub>, fueron cultivadas en cajas T-25 y su cosecha para los experimentos fue realizada cuando alcanzaron una confluencia del 80% con una solución de tripsina 0.25% - EDTA 0.02% de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Las células fueron contadas en un hematocitómetro y su viabilidad fue verificada utilizando una solución de azul tripano. Las células fueron consideradas para su uso cuando estas tuvieron al menos una viabilidad del 95%.

#### **4.2.2 Análisis de eficiencia de captura: preparación y procesamiento de muestras de sangre contaminada con células tumorales (*spiked blood samples*).**

Evaluar la eficiencia de captura del equipo Cytocatch de Delee Corp (Mountain View, CA, USA) implica, en una visión general, el paso de muestras de sangre de donadores sanos que son contaminadas con células provenientes de las líneas celulares cancerosas que incluimos en nuestro trabajo; estas muestras contaminadas también son llamadas *spiked blood samples*.

Antes de contaminar las muestras de sangre con la finalidad de realizar el conteo y evaluación de la eficiencia de captura de nuestro dispositivo, las líneas celulares, PC-3, LNCaP, DU-145, or VCaP fueron teñidas con CellTracker™ orange CMRA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, agregando a los cultivos celulares una solución de 25  $\mu\text{M}$  de CellTracker™ orange incubando las células en placas de 96 pozos durante 45 min bajo las condiciones señaladas previamente, las cuales también se respetaron para su cosecha y conteo previo a la contaminación. La solución resultante fue diluida de forma seriada hasta obtener un valor de 100 células cancerosas en 30  $\mu\text{L}$ , los cuales fueron agregados a los 7.5 mL de sangre provenientes de donadores sanos. Posteriormente las muestras contaminadas fueron diluidas en un volumen 1:2 con una solución de PBS que contiene formaldehído al 0.3% y solución pluronic F68 al 0.15%; las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente y el procesamiento se llevó a cabo de la siguiente manera.

- **Análisis de velocidad de flujo:** Se determinó utilizando la línea celular PC-3. Se trató la muestra con las condiciones previamente expuestas y esta fue procesada en el dispositivo Cytocatch utilizando una velocidad de flujo de 2 mL/min y de 3 mL/min con una membrana porosa de 8  $\mu$ M para evaluar cuál de los dos flujos fue la mejor opción para las condiciones de trabajo.
- **Análisis de tamaño de poro en la membrana de separación:** La determinación de qué tanto influye el tamaño de poro en la separación de las células tumorales de las muestras de sangre contaminada fue realizada probando tres diferentes membranas con tamaños de poro de 7  $\mu$ m, 8  $\mu$ m y 9  $\mu$ m.
- **Tinción *in situ*:** Para la observación al microscopio de los resultados de la corrida, las muestras teñidas utilizando una solución de Hoechst 33342 [1  $\mu$ g/mL] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a un flujo de 500  $\mu$ L/min durante 10 min. Previo a este paso, las muestras fueron lavadas con una solución de pluronic F68 al 0.1% en PBS. Las muestras fueron fijadas utilizando 10 mL de una solución de formaldehído al 0.4% con un flujo de 1 mL/min durante 10 min. Transcurrido el tiempo de ambas tinciones, la membrana fue lavada utilizando una solución de pluronic F68 0.1% en PBS con el fin de eliminar restos de las soluciones de fijación y tinción. Cabe recordar que el Hoechst 33342 es utilizado para teñir núcleos (tinción DAPI).
- Una vez terminada la tinción, la membrana de filtración es colocada sobre un portaobjetos para su montaje y posterior observación en el microscopio.

Se utilizó medio de montaje Fluoromount-GTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Ahora bien, para la estimación de cuántas células fueron recuperadas una vez transferidas en el filtro (eficiencia de captura), utilizamos como controles a las células cancerosas en suspensión (100 células), las cuales fueron agregadas a 10 pozos de una placa de 96 pozos.

#### 4.2.3 Sistema de imagen y visualización de las muestras

Una vez procesada la membrana, ésta es montada en un portaobjetos y es escaneada por el sistema de imagen desarrollo para la plataforma Cytocatch. El microscopio está compuesto por un sistema de imagen de cuatro canales de fluorescencia con un *stage* motorizado y una rutina de autoenfoco, el cual permite el escaneo completo de la membrana. Los archivos de imagen resultantes fueron utilizados para alimentar un algoritmo de visión mecánica, el cual realizó automáticamente los conteos de las CTC, mismas que fueron confirmadas por dos observadores independientes.

La estimación de eficiencia de captura fue obtenida de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de captura} = \frac{\text{Número de células capturadas}}{\text{Número de células contadas en los pozos}} \times 100$$

Por otro lado, la pureza fue calculada de la siguiente manera

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Número total de células tumorales}}{\text{Número total de eventos nucleados}}$$

#### **4.2.4 Análisis de viabilidad de las células tumorales en muestras contaminadas.**

Un reto interesante en el campo de estudio de las células tumorales es el cultivo de las mismas. Los cultivos de biopsias líquidas son retadores ya que requieren condiciones especiales que favorezcan el crecimiento en ambientes *in vitro*. Uno de los aspectos fundamentales en el potencial cultivo de estas células, es la viabilidad de las muestras que se procesan. Y aunque esto último no entró dentro de los objetivos de esta tesis, determinamos la viabilidad de las células tumorales simulando un ambiente real de muestra de laboratorio, con el objetivo de establecer una posible ruta para futuros estudios multiómicos o de evaluación de respuesta a una determinada terapia antitumoral..

Para determinar la viabilidad, llevamos a cabo el ensayo de LIVE/DEAD. El ensayo fue realizado utilizando células PC-3 las cuales fueron preteñidas con CellTracker™ blue CMF2HC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y luego fueron contadas hasta obtener una dilución de 1000 células, las cuales se agregaron a 7.5 mL de sangre provenientes de donador sano. Posteriormente, las muestras fueron diluidas con solución pluronic F68 0.15% en PBS en una relación 1:2 v/v e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de su procesamiento en el dispositivo Cytocatch bajo las condiciones señaladas previamente. Una vez que las muestras fueron filtradas, la membrana fue lavada con una solución de pluronic 0.1% en PBS a un volumen de 500 µl/min durante 10 minutos. Después, se hizo pasar una solución de 1 mL de

calceína AM 2  $\mu\text{M}$  - homodímero-1 de etidio 4  $\mu\text{M}$  a una velocidad de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ , seguidos de 45 min incubación a temperatura.

Finalizado este proceso, el holder fue desensamblado del dispositivo y la membrana fue montada en un portaobjetos para su análisis por microscopía de fluorescencia. Las células cuyo patrón de fluorescencia fue verde+/azul+ fueron categorizadas como células vivas; mientras que aquellas con patrón de fluorescencia azul+/rojo+ fueron categorizadas como muertas. La viabilidad fue calculada como porcentaje utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células tumorales vivas}}{\text{Número total de células tumorales}} \times 100$$

#### **4.2.5 Desarrollo de una prueba molecular con potencial uso en células tumorales circulantes.**

El potencial de las CTC va más allá de su conteo para cuestiones de diagnóstico clínico y establecimiento del pronóstico de la enfermedad. Las CTC ofrecen una valiosa plataforma de estudio para analizar la expresión génica de los tumores, en la bien llamada biopsia líquida. Uno de los problemas clínicos más importantes que se tiene en cáncer de próstata, es la resistencia terapéutica. La resistencia en CaP se da principalmente en algún punto de la vía de señalización del receptor de andrógenos, siendo este un blanco importante de las terapias hormonales.

Es por ello que nos dimos a la tarea de desarrollar una prueba basada en PCR punto final y secuenciación Sanger para monitorear mutaciones en una región del dominio de unión a ligando del AR.

El AR se divide en cuatro grandes dominios, dominio N terminal (NTD), dominio de unión a DNA (DBD), una bisagra y un dominio de unión a ligando (LBD). En el LBD, se concentran la mayor parte de las mutaciones que le confieren resistencia terapéutica al CaP, por lo que nos pareció un sitio interesante para estandarizar una metodología para buscar la mutación T878A en el AR.

Ahora bien, otro problema al que nos enfrentamos es la especificidad de una prueba molecular para detectar una mutación en CTC. Esto es debido a que en la membrana de filtración resultante tendremos una mezcla en donde, a pesar de tener un alta pureza, existe una cantidad considerable de leucocitos que aportan ácidos nucleicos al medio. Basados en ello, para evitar resultados equivocados a partir del ADN genómico de leucocitos decidimos buscar esta mutación en ARN, ya que al situarse dentro del AR, ya que éste no tiene una expresión en leucocitos, a diferencia de las CTC provenientes de la próstata. Para estandarizar esta técnica utilizamos las líneas celulares LNCaP y PC-3, así como sangre proveniente de donador sano en un volumen de 7.5 mL por muestra utilizada.

Se agregaron 15, 50, 250, 500 y 1000 células tumorales de la línea LNCaP en ensayos individuales a muestras de sangre de 7.5 mL provenientes de donador sano. Cada ensayo fue realizado bajo las condiciones estandarizadas

previamente. Después de la filtración, el dispositivo fue lavado durante 10 min con una solución de pluronic al 0.1% en PBS a un flujo de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  para lavar cualquier resto celular de residuos. Transcurrido este tiempo, la membrana fue transferida a un microtubo de 2 mL.

Se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit de extracción DNA/RNA FFPE de la casa comercial Qiagen (Venlo, Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se omitieron los pasos de desparafinado de la muestra. Una vez realizado el proceso, se cuantificó utilizando el NanoDrop 1000 y si las condiciones de calidad lo permitieron, se realizó la síntesis de cDNA completo utilizando el kit SuperScript IVTM First-Strand Synthesis System Full-length cDNA de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ahora bien, para secuenciar la región de interés realizamos dos PCR de punto final, la primera de ellas obtuvo un amplicón de 599 pb para la cual utilizamos los primers (F) 5'-CCAATGTCAACTCCAGGATGCTCTAC-3' y (R) 5'-AATCCCCAAGGCACTGCAGA-3. La composición de la reacción de PCR de punto final comprendió: 5  $\mu\text{L}$  de enzima Platinum SuperFi Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  de Enhancer (provisto en el mismo kit de la enzima), 1.25  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA a 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Axygen MaxyGene Thermal Cycler II de la marca Corning (Corning, NY, USA), en donde las condiciones de reacción utilizadas aparecen en la tabla número 3.

**Tabla 3. Condiciones de PCR de AR-599 PB**

Temperatura	Tiempo (min:seg)	Número de ciclos
98°C	00:30	1
98°C	00:10	40 ciclos
68.5°C	00:15	
72°C	00:20	
72°C	05:00	1

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2% y el ADN marcado con el intercalador SYBR Safe de la marca ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100-1000 pb de la marca Bioline (London, UK).

Los productos amplificados fueron purificados a partir del gel de agarosa con el propósito de hacer una re-amplificación de la región de estudio y su posterior envío a secuenciación. Para ello utilizamos el kit PureLink Quick Gel Extraction de la marca ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los productos amplificados fueron utilizados como templados para una reacción de PCR semi-anidada, en la que se utilizó un nuevo par de primers que restringe el tamaño del producto amplificado a 181 pb.

El segundo set de primers tienen la secuencia (F) 5'-AAATCCCACATCCTGCTCAAGACG-3' y (R) 5'-AAGGATCTTGGGCACTTGCACA-3'. La composición de la reacción de PCR de punto final comprendió: 5 µL de enzima Platinum SuperFi Master Mix, 2 µL de Enhancer (provisto en el mismo kit de la enzima), 0.5 µL de cada primer a 10 µM, 4 µL de agua y 1 µL de cDNA a 20 ng/µL. La reacción fue llevada a cabo en un

termociclador Axygen MaxyGene Thermal Cycler II de la marca Corning (Corning, NY, USA), en donde las condiciones de reacción utilizadas fueron las que se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones de PCR de AR-181 pb.**

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (min:seg)</b>	<b>Número de ciclos</b>
98°C	00:30	1
98°C	00:10	
57°C	00:15	40 ciclos
72°C	00:20	
72°C	05:00	1

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2% y el ADN marcado con el intercalador SYBR Safe de la marca ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100-1000 pb de la marca Biorline (London, UK).

Finalmente, los productos de PCR fueron enviados a secuenciar por el método de Sanger al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia de referencia del ARNm del AR (NM\_000044.4).

### **4.3 Metodología del objetivo 2: “Implementar un protocolo clínico piloto para la detección de células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de próstata (fase in vivo)”**

A continuación, se muestra los procedimientos llevados a cabo para la preparación, procesamiento y tinción inmunofluorescente en la membrana de separación de las CTC.

#### **4.3.1 Tipo de estudio y obtención de muestras**

Esta fase del proyecto, consistió en un estudio prospectivo de casos y controles para el estudio de CTC de CaP. Nuestro protocolo fue autorizado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González” bajo la clave UR16-00007. Los criterios de inclusión para los casos fueron: pacientes de CaP metastásico que aceptaran participar en el estudio, sin discriminar si fueron de nuevo diagnóstico o bien si ya estaban cursando alguna terapia de bloqueo hormonal, quirúrgica o radioterapia. Por otro lado, los criterios de exclusión fueron: pacientes que no dieran su consentimiento de participación o bien que tuvieran CaP en un estadio de enfermedad localizada o localmente avanzada. Finalmente, tuvimos como criterios de eliminación muestras de calidad insuficiente al momento del procesamiento de la muestra. Todas las muestras provinieron de la Consulta de Urología de nuestro Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

En relación a los controles, los criterios de inclusión fueron: hombres mayores de 18 años, que dieran su aprobación y firma de participación y que además no cursaran alguna enfermedad tumoral maligna o benigna de la próstata.

Todas las muestras fueron tomadas por punción de la vena cefálica accesoria (venopunción convencional) utilizando tubos de recolección de sangre BD Vacutainer K2-EDTA (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Por convención al estándar de oro de CTC, se recolectó sangre suficiente para alcanzar los 7.5 mL. Una vez recolectado, cada tubo fue suavemente mezclado por inversión aproximadamente 8 veces y su transporte fue realizado a temperatura ambiente. Se recomienda procesar las muestras durante las primeras tres horas posteriores a la toma de la muestra y no transportarlas en hielo, ya que esto favorece la formación de coágulos y por ende un cambio en las condiciones de filtrado de la muestra.

#### **4.3.2 Procesamiento de las muestras de sangre**

Cada muestra fue diluida en una razón 1:2 v/v con una solución de PBS que contuvo 0.3% de formaldehído-0.15% pluronic F68 e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron filtradas en el dispositivo Cytocatch de la casa comercial Delee Corp. (Mountain View, CA, USA). Las condiciones que se utilizaron para ellas fueron con la membrana de filtración de 7  $\mu\text{m}$  a una velocidad de flujo de 2 mL/min. El flujo fue monitoreado y mantenido utilizando los sensores y el Zen Fluidics Pressure and Flow Controller de la marca Zen Fluidics (Sunnyvale, CA, USA).

### 4.3.3 Inmunotinción *in-situ*

Una vez que las muestras fueron filtradas, la membrana fue lavada con una solución de pluronic F68 0.1% en PBS. Las muestras fueron fijadas utilizando un volumen de 1 mL de una solución de formaldehído en PBS al 4%, el cual pasó a través del equipo a un flujo de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se incubó durante 10 min. Posteriormente, se realizó la permeabilización pasando 1 mL de una solución de PBST 0.3% a un flujo de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  seguido de 10 minutos de incubación. Con el objetivo de prevenir uniones no específicas de los anticuerpos utilizados, se realizó un bloqueo haciendo pasar 1 mL de BSA 1% en PBST 1% a un flujo de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  seguido de un período de incubación de 30 minutos. Luego, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de un cóctel de anticuerpos compuesto de anti-citoqueratina etiquetada con alexa fluor® 488 (panreactiva, clona C-11)(100), anti-CD45 humano alexa fluor ® 647 (clona HI30) y anti-PSMA (*FOLH1*) biotinilada (clona LNI-17) todos ellos de la casa comercial BioLegend (San Diego, CA, USA) en una solución BSA 1%- PBST 0.1% a un flujo de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  seguido de una incubación a temperatura ambiente de 1 hora. Al terminar este período, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Hoechst 33342 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de conjugado de estreptavidina-alexa fluor ® 568 de la marca Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) en una solución de BSA 1%-PBST 0.1% a un flujo de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Terminado esto, se dejó incubar durante una hora. Cabe señalar que todos los pasos anteriores que requirieron procesos de incubación durante la inmunotinción, fueron seguidos de un paso de lavado de 5 min llevado a cabo a un flujo de 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  con las soluciones de BSA1%-PBST 0.1%. Posterior al proceso de fijación

y al último paso de lavado, se utilizó una solución de pluronic F68 0.1% en PBS, debido a que la solución de 0.1% PBST pudiera haber dejado restos de los pasos anteriores.

#### **4.3.4 Análisis de las membranas**

Una vez procesada la membrana, ésta fue montada en un portaobjetos y escaneada por el sistema de imagen desarrollado para la plataforma Cytocatch. El microscopio está compuesto por un sistema de imagen de cuatro canales de fluorescencia con un *stage* motorizado y una rutina de autoenfoco, el cual permite el escaneo completo de la membrana. Los archivos de imagen resultantes fueron utilizados para alimentar un algoritmo de visión mecánica, el cual realizó automáticamente los conteos de las CTC, mismas que fueron confirmadas por dos observadores independientes

#### **4.3.5 Identificación de CTCs**

Terminado el procesamiento de la imagen a través del algoritmo, las CTC fueron definidas y enumeradas como células nucleadas (DAPI+, color azul) con los fenotipos CK+/PSMA+/CD45-, CK+/PSMA-/CD45- y CK-/PSMA+/CD45-.

#### **4.3.6 Análisis estadístico**

Todos nuestros experimentos en líneas celulares fueron realizados por triplicado. Los resultados derivados de ellos fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para los análisis de los pacientes y los controles, también se reportaron las medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

En ellas, se realizó un análisis de diferencia de medias mediante una prueba de T y se tomó una significancia estadística cuando el resultado de  $p$  fue menor a 0.05.

#### **4.4 Metodología del objetivo 3: En una cohorte de pacientes y sujetos sin enfermedad tumoral, determinar las frecuencias alélicas de las variantes A49T y V89L y sus potenciales implicaciones clínicas**

Fue de nuestro particular interés conocer las características alrededor de variantes genéticas en la secuencia del gen *SRD5A2*, el cual codifica para la enzima 5 alpha-reductasa 2.

Estas variantes genéticas o polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) que han estudiado para conocer los posibles efectos que tienen sobre la vía de actividad del AR. En este trabajo analizamos las frecuencias alélicas de las variantes A49T (p.Ala89Thr, rs523349) y V89L (p.Val89Leu, rs523349) de la enzima 5a-reductasa.

##### **4.4.1. Tipo de estudio y selección de sujetos de investigación.**

Para ello, realizamos un estudio en una cohorte de sujetos mexicanos en donde incluimos casos y controles. Los criterios de inclusión que utilizamos para nuestros pacientes (n=101) fueron sujetos diagnosticados con cáncer de próstata, sin discriminar su estatus de tratamiento o tiempo de evolución de la enfermedad. Como criterios de exclusión tuvimos que fueran hombres con alguna infección causada por los virus de inmunodeficiencia humana o hepatitis B/C. Nuestro único criterio de eliminación fue que las muestras tuvieran baja calidad al momento de realizar la extracción de ADN. Los controles fueron sujetos sin CaP divididos en

hombres sin anormalidades prostáticas (n=60) y con hiperplasia prostática benigna (HPB, n=40).

#### **4.4.2 Recolección de muestras**

A cada uno de los sujetos de estudio, se les invitó a participar en el presente proyecto, dándoles una explicación sencilla y en un lenguaje coloquial para el conocimiento de la importancia de su participación. Una vez firmado su consentimiento informado de participación, a cada uno de los pacientes se le tomó una simple muestra de sangre de 6 mL en tubos de recolección de sangre BD Vacutainer K2-EDTA (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

#### **4.4.3 Procesamiento de las muestras**

El proceso de extracción de DNA de las muestras inició con su centrifugación a una velocidad de 3,200 rpm/min durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, a cada muestra se le separó el plasma y este fue almacenado en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y puestos a temperatura de -80°C, todo ello con el fin de formar un biobanco de plasma de pacientes con CaP y estar en posición de realizar estudios posteriores a este trabajo que impliquen la detección de alguna proteína en el plasma.

Ahora bien, la extracción de DNA se realizó a partir de la capa de leucocitos o también conocida como *buffy coat*. Estos fueron separados en volúmenes de 200 µL hasta completar un volumen de 600 µL en un microtubo de fondo redondo de 2 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y almacenados a y almacenados a una

temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , todo ello con el fin de formar un biobanco de plasma de pacientes con CaP y estar en posición de realizar estudios posteriores a este trabajo que implique la detección de alguna proteína.

#### **4.4.4 Extracción, cuantificación y análisis de calidad de DNA**

La extracción de ADN se realizó utilizando el método de lisis por TSNT de la siguiente manera (101-103):

1. A 500  $\mu\text{L}$  de sangre (buffy coat) se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis TSNT (Tritón 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM a pH8) y se mezcló a alta velocidad utilizando un vórtex durante 30 segundos.
2. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de fenol grado biología molecular y se homogenizó utilizando vórtex a alta velocidad durante 1-3 minutos hasta observar una solución de aspecto lechoso o marrón. Durante este paso se cuidó llegar a una homogenización completa.
3. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de fenol-sevag y se mezcló en vórtex a alta velocidad durante 3-5 minutos. Se observó la formación de una solución de aspecto lechoso y homogéneo.
4. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE y se mezcló en vórtex a alta velocidad durante 1 minuto.
5. Se centrifugó la mezcla durante 8 minutos a una velocidad de 10,000 rpm. Transcurrido el proceso, se separó la fase acuosa (la superior) a un nuevo microtubo de 2 mL y se repitieron los pasos 3-5.

6. Considerando la fase acuosa obtenida, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto grado biología molecular o HPLC y se mezcló por inversión. Fue observada la formación de una hebra blanca (ADN) y se dejó precipitar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
7. Los microtubos con el ADN fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
8. El sobrenadante fue decantado y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (preparado a partir de etanol absoluto grado biología molecular o HPLC). Se lavó la pastilla resuspendiendo la muestra durante 5 min y fue repetido el paso 7.
9. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN durante un tiempo máximo de 20 min.
10. Finalmente, el DNA obtenido fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de TE 1X.

Una vez concluida la extracción, se realizó la cuantificación del DNA obtenido utilizando espectroscopía de ultravioleta en el equipo NanoDrop 1000 de la casa comercial ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Como resultado de esta cuantificación, se obtuvieron las proporciones de absorbancia a 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm con resultados esperados entre 1.8 y 2 y mayores que 2, respectivamente.

Terminado este proceso, se siguieron dos pruebas de calidad para evaluar la integridad del ADN obtenido. Estas pruebas fueron A) observación en un gel de agarosa al 1% para evaluar integridad y B) análisis de amplificabilidad del ADN obtenido utilizando una PCR punto final de un fragmento del gen B-globina.

#### **4.4.5 Electroforesis en gel de agarosa al 1%**

1. Fueron pesados 0.3 gramos de agarosa grado biología molecular de la casa comercial Oxoid (Basingstoke, UK) y disueltos en 30 mL de buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM); posteriormente, fueron fundidos sobre una plancha de calentamiento hasta observar una solución transparente.
2. Se agregó la solución de agarosa a la cámara de electroforesis y se dejó solidificar el gel.
3. La integridad se analizó agregando 500 ng de cada una de las muestras obtenidas.
4. Se realizó la electroforesis a un voltaje de 90 mV durante 40 min.
5. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio 0.5 mg/mL y fueron observadas en un transiluminador.

#### **4.4.6. PCR punto final de un fragmento del gen de $\beta$ -globina**

La genotipificación de las variantes de interés se realizó por PCR en tiempo real. Primero se comprobó que los DNA incluidos en el estudio fueran amplificables, por lo que se eligió probarlos mediante la PCR de punto final de un fragmento de 268 pb del gen *b-globina*.

Para ello, se preparó una alícuota de cada muestra a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. La reacción de PCR se preparó de la siguiente manera: 5  $\mu$ L de GoTaq® colorless Master Mix 2X (PROMEGA, Wisconsin, USA), 0.2  $\mu$ L de ambos primers a una concentración cada uno de 10 mM, 1  $\mu$ L de ADN a una

concentración de 100 ng/μL y 3.6 μL de agua. Los primers utilizados tuvieron las secuencias siguientes: 5'- ccacttcacccacggtcacc - 3' y 5'- gaagagccaaggacaggtac - 3 para forward y reverse, respectivamente. Por otro lado, el programa de PCR que se utilizó fue una desnaturalización inicial a 95°C/5min, seguido por 35 ciclos consistiendo cada uno de una desnaturalización a 94°C/1min, alineamiento a 53°C/1min y extensión a 72°C/1min; finalmente, una última extensión a 72°C/6min. La reacción se llevó a cabo en un MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) (101). Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2% (preparado en las mismas condiciones que en el inciso anterior, sólo modificando la cantidad de agarosa).

#### **4.4.7. Genotipificación**

Los experimentos de genotipificación fueron realizados empleando la técnica de sondas TaqMan de la casa comercial ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Para ello se utilizó el termociclador de PCR en tiempo real StepOne Plus de la casa comercial Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Las muestras fueron colocadas en placas de 96 pozos de la marca Scientific Specialties (Lodi, CA, USA). La distribución que guardaron las muestras en las placas tuvo en las primeras tres posiciones los controles positivos para cada una de las variantes a evaluar y al final tres controles negativos de reacción.

Los ensayos utilizados para la detección fueron TaqMan SNP Genotyping Assays probes C\_27532228\_20 and C\_2362601\_10 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para las variantes A49T (rs9282858) y V89L (rs523349),

respectivamente. Las reacciones fueron constituidas de la siguiente manera: 5  $\mu\text{L}$  de SensiFAST™ Hi-Rox Genotyping Kit de la marca Biorline (Memphis, TN, USA), 0.5  $\mu\text{L}$  de la sonda, 1.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas and 3  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración final de 100 ng/ $\mu\text{L}$ . El programa de PCR que se utilizó fue el precargado por el equipo para ensayos utilizando sondas TaqMan y consistió en Pre-PCR 60°C/30 s, Holding Stage 95°C/10 min, 40 ciclos de: 1) 95°C/15 s and 2) 60°C/1 min, and Post PCR Read 60°C/30 s. Los resultados crudos de la reacción fueron analizados utilizando el StepOne™ Software v.2.2.2, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### **4.4.8 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Golden Helix SNP & Variation Suite 8.8.3 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA). Las variantes genéticas fueron analizadas mediante una prueba de exactos de Fisher para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg, se tomó un valor de  $p < 0.05$  como indicador de diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, los estudios de asociación de variantes genéticas fueron llevados a cabo utilizando los modelos genéticos de dominancia y recesividad para evaluar los Odds Ratio, empleando un intervalo de confianza del 95% (CI, por sus siglas en inglés), los valores de P Bonferroni P-values, y las tasas falsas de descubrimiento (FDRs por sus siglas inglés) (57).

Para los estudios de asociación, implementamos un modelo de regresión logística lineal stepwise utilizando un modelo genético aditivo codificando los

genotipos (A49T= AlaAla vs. ThrThr, AlaAla+AlaThr vs. ThrThr, AlaAla vs. AlaThr+ThrThr; V89L= ValVal vs. LeuLeu, ValVal+ValLeu vs. LeuLeu, ValVal vs. ValLeu+LeuLeu), utilizando el índice de masa corporal y la edad como covariables en el modelo reducido. La prueba de Bonferroni múltiple y las correcciones FDR's fueron consideradas para indicar si hubo o no diferencia estadísticamente significativa.

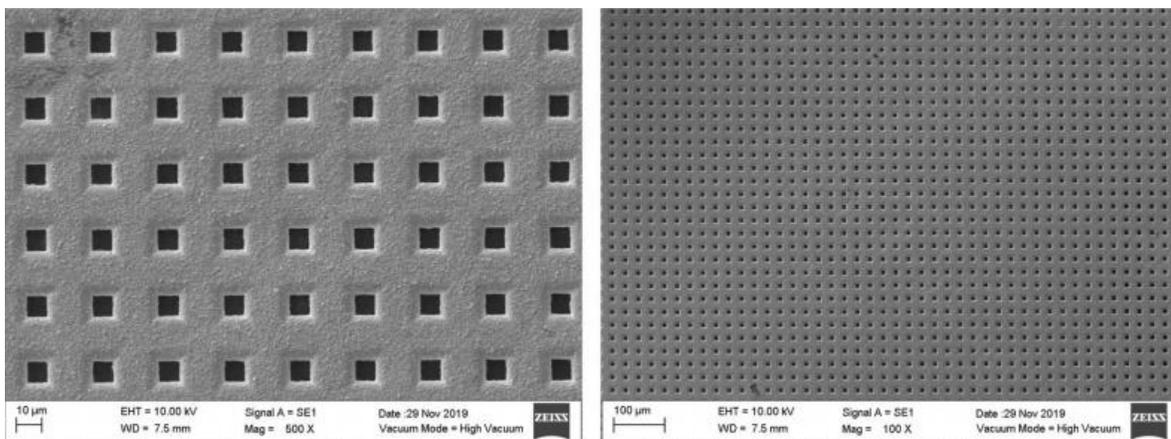
## Capítulo 5

### Resultados

#### 5.1 Resultados objetivo 1: Realizar la caracterización de una plataforma de detección de células tumorales de cáncer de próstata utilizando una plataforma de microfiltración.

##### 5.1.1 Caracterización morfológica de la membrana

Al ser una nueva metodología planteada para el aislamiento y posterior análisis de CTC, uno de los primeros análisis que realizamos fue la caracterización de la membrana de filtración a través de microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscope*, SEM por sus siglas en inglés). Además, hicimos un análisis elemental para asegurar los elementos que la componen. Dichos resultados podemos observarlos en la figura 12.



**Figura 12. Microscopía electrónica de barrido de las membranas.** Observamos del lado izquierdo la membrana de filtración en una magnificación de 500 X, mientras que del lado derecho es observada la misma membrana a 100X.

Como podemos observar en las imágenes derivadas del SEM, la membrana de filtración fue fabricada por un método conocido como electroformado, presenta una conformación homogénea de pozos con geometría cuadrada. En la figura se observa la membrana con ancho de poro de  $7\mu\text{m}$ , aunque se evaluaron además membranas con ancho de poro de  $8\mu\text{m}$  y  $9\mu\text{m}$ . Más adelante en esta sección de resultados, detallamos cuál tamaño de poro fue elegido. La disposición en cuadrados, y no en poros circulares, estuvo determinada por la disponibilidad del fabricante, más que por algún factor biológico determinado.

### **5.1.2 Caracterización del sistema de procesamiento de imagen de CTC.**

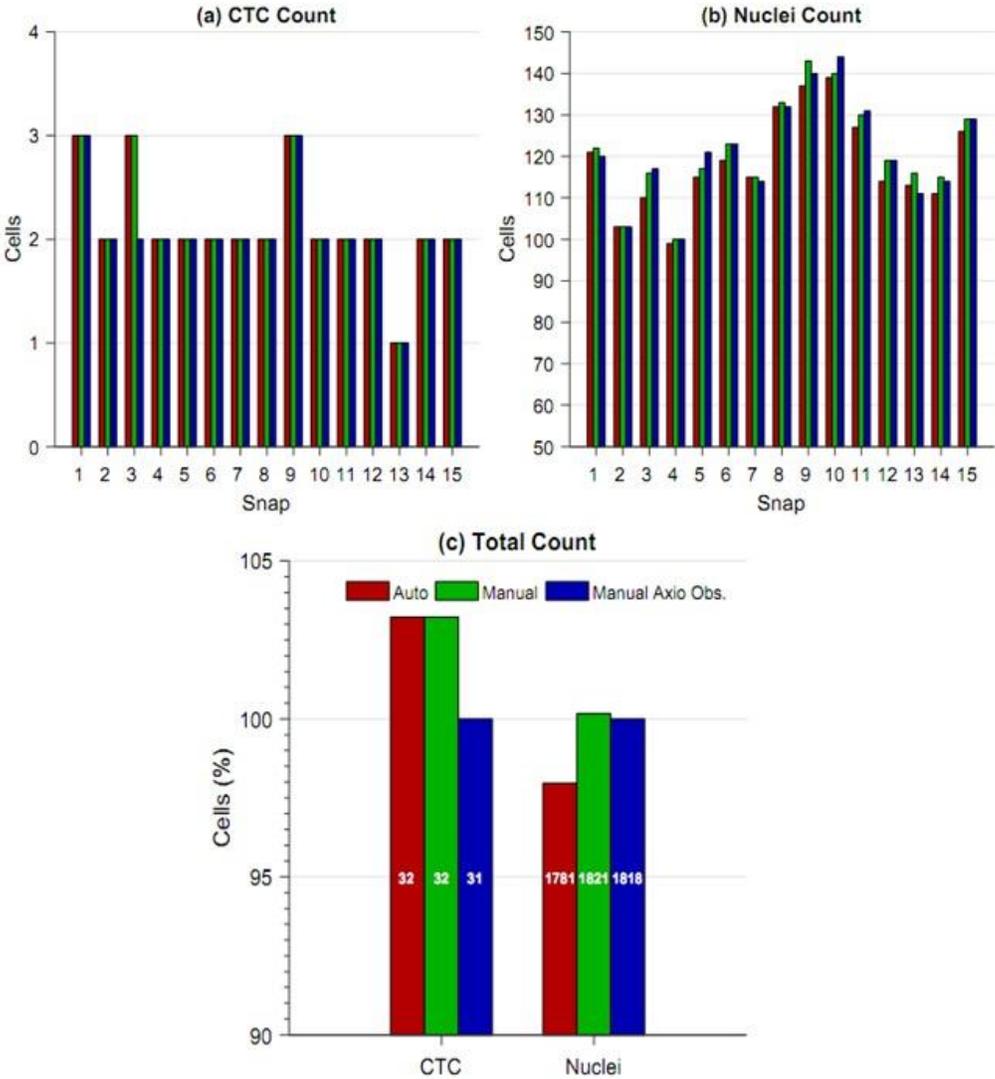
A raíz de la naturaleza metodológica, el sistema Cytocatch fue desarrollado en conjunto con una plataforma de imagen. Esta plataforma está compuesta por un sistema de microscopía de epifluorescencia, que cuenta con un *stage* automatizado con una rutina de autoenfoco y equipado con filtros específicos para los anticuerpos de marcaje que utilizamos en este trabajo. Además, como ya se ha mencionado, la plataforma cuenta con un algoritmo de reconocimiento capaz de discriminar los eventos fluorescentes y así categorizar las CTC de los pacientes incluidos en el estudio. Los resultados de este sistema de imagen fueron comparados con un microscopio Axio Observer de la marca Carl Zeiss (Oberkochen, Alemania), el cual está equipado con un *stage* motorizado, una fuente de luz LED Colibri 7 (se utilizaron las longitudes de onda 385 nm, 475 nm, 555 nm y 630 nm), una cámara AxioCam 506 mono, un set de filtros 90 HE DAPI/GFP/Cy3/Cy5 y un objetivo Plan-Neofluar 10X.

En primera instancia, determinamos si existió una diferencia entre los conteos realizados por los sistemas de imagen del Cytocatch, Axio observer y un contador manual.

Resalto que esta parte de la experimentación consistió en analizar las células provenientes de la línea celular PC-3 preteñidas con Celltracker naranja y posteriormente procesadas con 7.5 mL de sangre, así como una tinción posterior con Hoechst 33342 (núcleos, color azul).

Durante las caracterizaciones, encontramos que los mejores parámetros para la visualización de las muestras fueron a 25 ms y 200 ms, como tiempos de exposición para los colores naranja y azul, respectivamente. Por otro lado, los párametros que determinamos con el microscopio Axio Observer fueron de 90 ms y 2000 ms de tiempo de exposición para los colores azul y naranja, respectivamente. En ambos casos, se procesaron 15 imágenes representativas de las distintas áreas de la membrana de filtración. Para el análisis consideramos como célula tumoral, aquella que fuera positiva al brillo en los canales azul/naranja. Las imágenes obtenidas respecto a los conteos manuales realizados representan una diferencia de 1 célula tumoral. Esta diferencia podría estar debida a que la imagen obtenida en el color naranja tuvo una mejor resolución en el microscopio del sistema Cytocatch que en el Axio Observer, Por otro lado, la diferencia encontrada entre los conteos de células nucleadas probablemente es debida al reconocimiento de células tumorales por parte del algoritmo. Esto sirvió como evidencia para darle la instrucción de, además de reconocer diferencias en la expresión de los marcadores elegidos, agregar una distinción de los contornos

de las células tumorales, ya que algunas de ellas pudieran estar en una distancia muy pequeña que pudiera dificultar su identificación. La figura 13 condensa estos resultados.



**Figura 13. Resultados de los conteos de células por imagen.** Rojo/verde conteos automático y manual Cytocatch™ y azul conteo Axio Observer. Se tomaron 15 imágenes representativas (*snap*, eje X de las gráficas) de cada membrana y en cada una de ellas se contaron a) las células tumorales, b) los

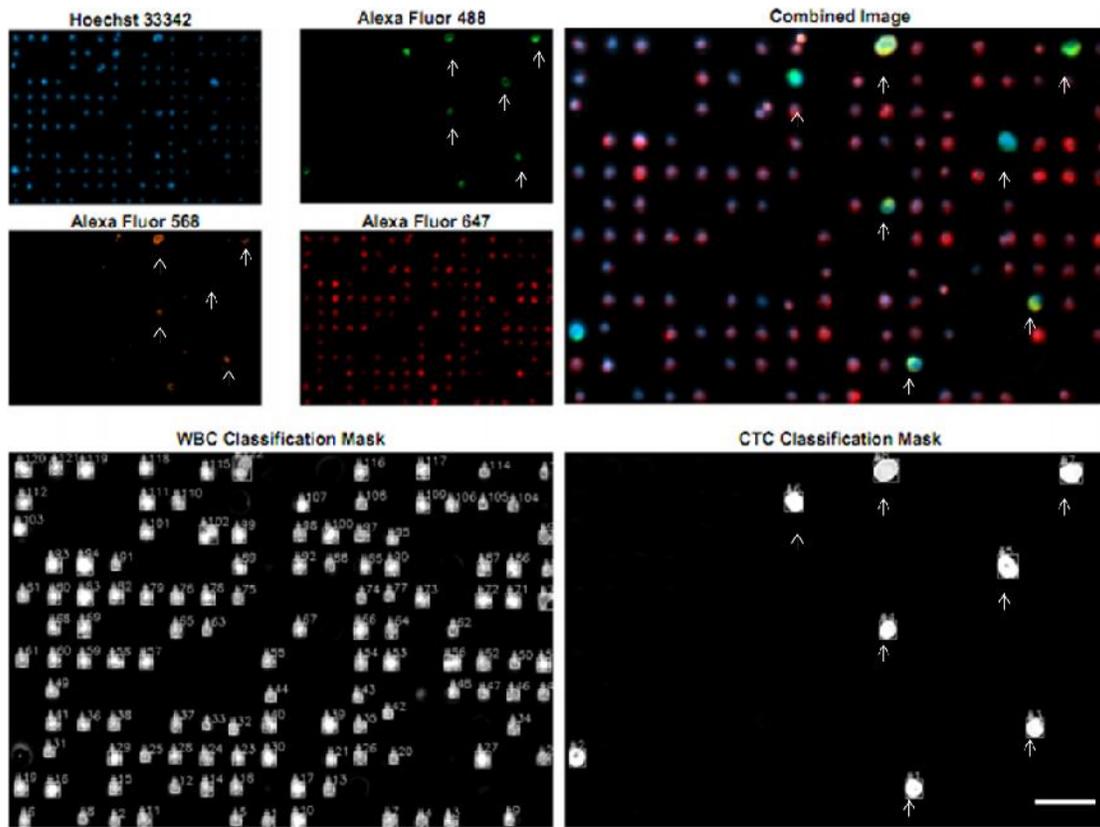
eventos nucleados totales y c) los porcentajes celulares acumulados en cada caso (eje Y de las gráficas).

Los resultados de la estandarización del sistema de imagen que incluyen a los cuatro canales, Hoechst 33342 para núcleos (AZUL), Alexa Fluor 488 Pan-CK (verde), Alexa Fluor 569 anti-PSMA (naranja) y Alexa Fluor 647 anti-CD45 (rojo), para la identificación de células tumorales aparecen a continuación en la tabla número 5. Los hallazgos muestran que tiene una mayor eficiencia al requerir menores tiempos de exposición para encontrar las mejores imágenes de cada marcador, por lo que el sistema Cytocatch permite la identificación eficiente de las células tumorales con mejores rendimientos comparados contra el sistema Axio Observer Zeiss.

**Tabla 5. Tiempos de exposición encontrados en ambas plataformas.**

<b>Microscopio</b>	<b>Canal</b>	<b>Tiempo de exposición ms</b>
<b>Sistema</b>	Hoechst 33342 (Azul)	50
<b>Cytocatch</b>	anti-CK (Verde)	100
	Anti-PSMA (Naranja)	100
	Anti-CD45 (Rojo)	1500
<b>Axio Observer</b>	Hoechst 33342 (Azul)	200
<b>Zeiss</b>	anti-CK (Verde)	2500
	Anti-PSMA (Naranja)	3000
	Anti-CD45 (Rojo)	4500

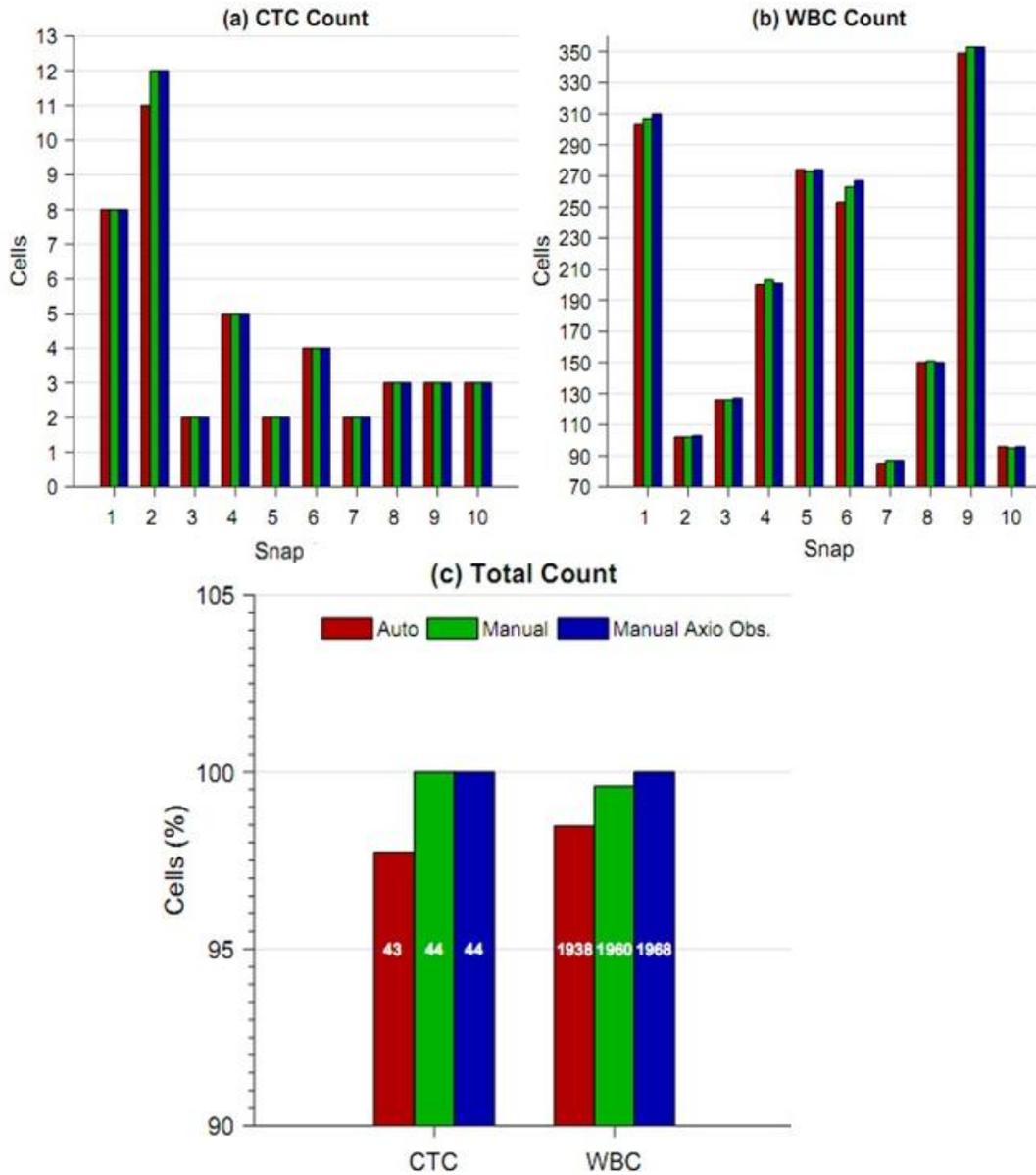
A continuación, la figura 14 representa una imagen típica del algoritmo al momento de procesar la imagen obtenida de la tinción realizada como parte del proceso de estandarización.



**Figura 14.** Imagen típica generada por el algoritmo. En el cuadrante superior observamos las señales de cada marcador, mientras que en el panel superior derecho encontramos la combinación de las señales. Una célula tumoral se identificó como nucleada (Hoechst 33342, azul), CK+ (verde), PSMA+ (naranja), CD45- (ausencia de rojo) y con tamaños de al menos 7  $\mu\text{m}$ . Los leucocitos fueron categorizados como células nucleadas (azul) y CD45+ (rojo) con tamaños de entre 2.5  $\mu\text{m}$  – 7  $\mu\text{m}$ . Los paneles inferiores muestran un panorama representativo de cómo el algoritmo realiza el reconocimiento de las células tumorales; observamos

que hace una identificación independiente en cada canal de fluorescencia y al final es capaz de distinguir los eventos fluorescentes correspondientes de las células tumorales que de los leucocitos.

Los resultados de los conteos de las células tumorales mostraron una concordancia del 97.72%, con solamente una célula tumoral de diferencia debido a que en una de las imágenes dos células se encontraron espacialmente muy próximas una de la otra, por lo que el algoritmo la contó solamente como un evento. La observación manual pudo determinar esta diferencia. Ahora bien, en cuanto a la reproducibilidad entre los conteos manuales para cada plataforma de adquisición de imágenes coincidió en un 100%, es decir, los conteos manuales de células tumorales de los sistemas Cytocatch y Axio Observer Zeiss fueron idénticos; mientras que, la diferencia entre los conteos de leucocitos fue del 0.4% (8 células). La figura 15 muestra los resultados de las muestras de sangre contaminadas con la línea celular a través de las dos plataformas de análisis y su visualización con los cuatro canales de fluorescencia.



**Figura 15. Resultados de los conteos por imagen entre plataformas.** En esa imagen se tomaron en cuenta los cuatro canales de fluorescencia para la identificación de células tumorales. En rojo y verde aparecen los conteos automáticos y manuales del sistema Cytocatch, respectivamente; azules, conteos Axio Observer Zeiss. El eje X de las gráficas a) y c) representa cada uno de las imágenes obtenidas de los conteos celulares para células tumorales y leucocitos,

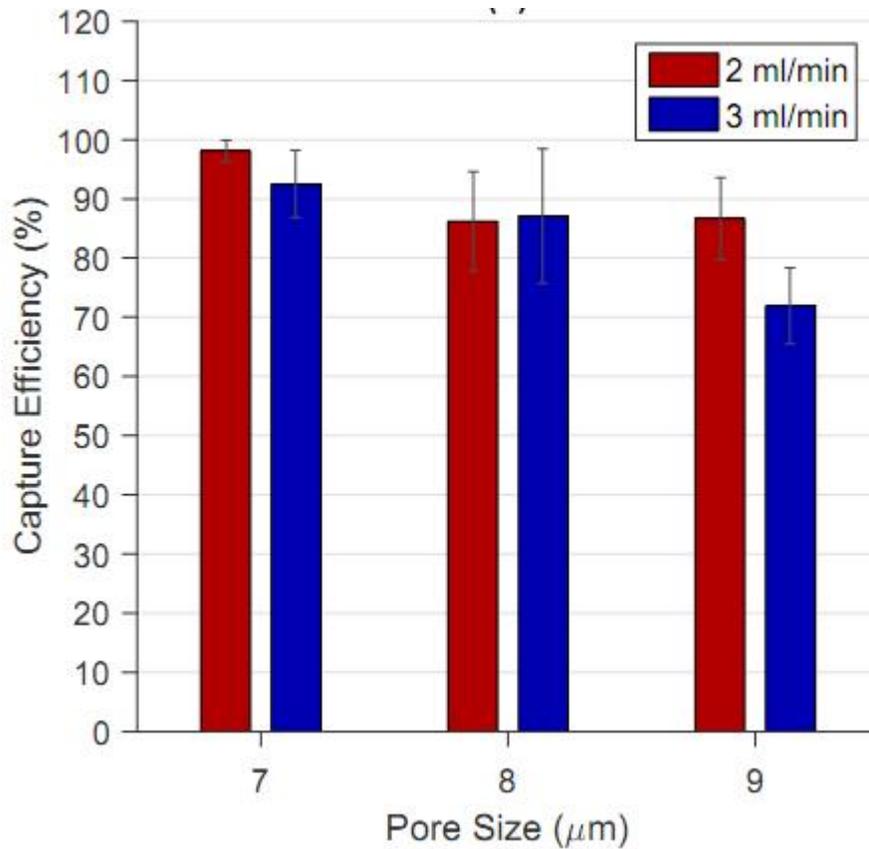
mientras que el eje Y representa las células contadas. La gráfica c) muestra en el eje X a las células tumorales y los leucocitos mientras que el eje Y muestra los porcentajes de células contados.

Existió una marcada diferencia entre los resultados de ambas plataformas es en los tiempos de procesamiento. Consideramos que estos cambios podrían estar explicados por la selección de componentes ópticos para la construcción del microscopio. Un experimento de escaneo de una muestra en el sistema Cytocatch llevaría aproximadamente un tiempo de 1.5 horas con la rutina de autoenfoco (30 minutos sin autoenfocar), mientras que con el sistema del Axio Observer Zeiss toma alrededor de 4 horas.

### **5.1.3 Variación entre la velocidad de procesamiento y los tamaños de poro de la membrana de filtración**

Para determinar cuál velocidad de procesamiento fue la mejor, utilizamos la membrana de 7  $\mu\text{m}$  sobre la cual se hizo pasar la muestra de donador sano y las células PC-3. Encontramos que utilizando las condiciones de 2 mL/min se obtuvo una eficiencia de captura promedio de  $98.09\% \pm 1.82\%$ ; los tamaños de poro de 8  $\mu\text{m}$  los promedios de eficiencia de captura se mantuvieron superiores al 85% y en niveles similares para ambas velocidades de procesamiento. Por otro lado, al utilizar la membrana porosa de 9  $\mu\text{m}$  los valores de eficiencia de captura a una velocidad de 2 mL/min fueron similares para los hallados en la membrana de 8  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, al evaluar el flujo de 3 mL, la eficiencia de captura se redujo a un

valor de  $72\% \pm 6.45\%$ . En resumen, estos resultados pueden observarse en la figura 16.



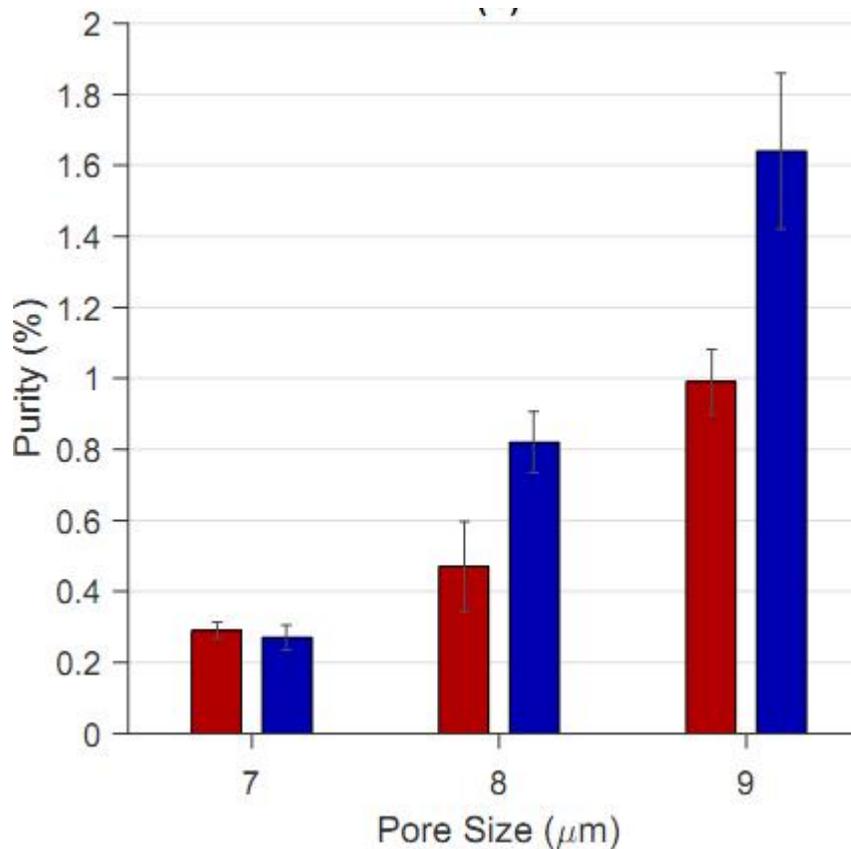
**Figura 16. Eficiencia de captura calculada.** Se muestran los resultados a diferentes tamaños de poro utilizando dos velocidades de procesamiento de muestra, los mejores resultados se obtuvieron a un flujo de 2 mL/min y un tamaño de poro de 7  $\mu\text{M}$ .

En general, el número de eventos contaminantes - es decir, de células leucocitarias - disminuyó a medida que aumentaron los tamaños de poro y las velocidades de procesamiento. Por ejemplo, cuando utilizamos la membrana de 9  $\mu\text{m}$  observamos en promedio  $745 \pm 65$  eventos nucleados capturados el cual es

considerablemente más bajo que cuando se utilizó la membrana de 7  $\mu\text{m}$  a una velocidad de 2 mL/min en donde se obtuvieron  $4144 \pm 315$  células nucleadas capturadas.

#### **5.1.4 Análisis de la pureza de las muestras procesadas**

La figura 17 muestra los resultados generales de la evaluación de la pureza de las muestras procesadas. Basados en el análisis inmediato anterior del conteo de eventos nucleados, los resultados de pureza estuvieron dentro de un rango promedio de  $1.64\% \pm 0.22\%$  (membrana 9  $\mu\text{m}$ ) y  $0.29\% \pm 0.02\%$  (membrana 7  $\mu\text{m}$ ), respectivamente. Es por ello que basados en los resultados de eficiencia de captura y de pureza obtenidos, decidimos en adelante utilizar como condiciones de trabajo el procesamiento de las muestras con una membrana porosa con un tamaño de 7  $\mu\text{m}$  a una velocidad de procesamiento de 2 mL/min, para favorecer la captura del mayor número de células tumorales, a pesar de la pureza, debido a que con los métodos de identificación la discriminación entre leucocitos y CTCs se realiza fácilmente



**Figura 17. Pureza obtenida analizando los distintos tamaños de poro.** En rojo se observan los resultados de pureza a un flujo de 2 mL/min y en azul a 3 mL/min.

Acorde a lo anterior, el siguiente parámetro evaluado fue la eficiencia de captura utilizando diferentes líneas celulares. En la metodología mencionamos que además de la línea cancerosa de próstata PC-3, agregamos a nuestro estudio *in vitro* el análisis sobre las líneas celulares VCaP, DU-145 y LNCaP. Siguiendo la misma metodología, agregamos 100 células de cada línea a muestras de 7.5 mL de sangre provenientes de donadores sanos las cuales fueron procesadas junto a sus respectivos controles, tal y como se describió en la sección de metodología.

Como resultado, las eficiencias de captura para las líneas celulares restantes fueron de  $99.51\% \pm 1.47\%$ ,  $94\% \pm 3.60\%$ , y  $98.92\% \pm 2.06\%$  para VCaP, DU-145, y LNCaP, respectivamente. La desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) para los diferentes experimentos llevados a cabo en las distintas líneas celulares fue del 1.93 al 6.65%. Nuestros resultados sugieren que el aislamiento de células tumorales utilizando este enfoque de separación en el dispositivo Cytocatch™ (Delee Corp., CA, USA) tienen una alta eficiencia de captura, pureza y reproducibilidad entre los ensayos, necesarios para lograr las capturas de las células.

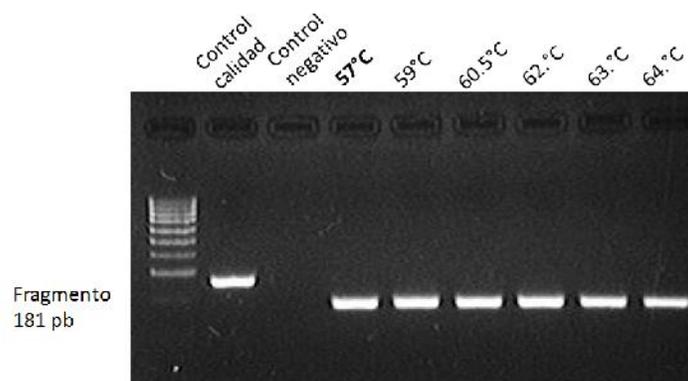
#### **5.1.5 Ensayos de viabilidad de las células capturadas**

Los resultados del ensayo de LIVE/DEAD mostraron en promedio una viabilidad del  $90.3\% \pm 0.88\%$  de las células tumorales que contaminaron una muestra de sangre de donador sano. Por otro lado, para tener un punto de comparación, utilizamos la misma cantidad de células en suspensión, las cuales no fueron procesadas en el dispositivo y obtuvieron una viabilidad del  $96\% \pm 1.53\%$ . Este hecho demuestra que las fuerzas de corte (*shear stress*) que se producen sobre las células tumorales dentro de la muestra de sangre que es procesada en el dispositivo, es mínima y derivado de ella se obtienen células con altas tasas de viabilidad que tienen el potencial de ser cultivadas en el laboratorio para estudios posteriores.

### 5.1.6 Prueba molecular con potencial uso en CTCs

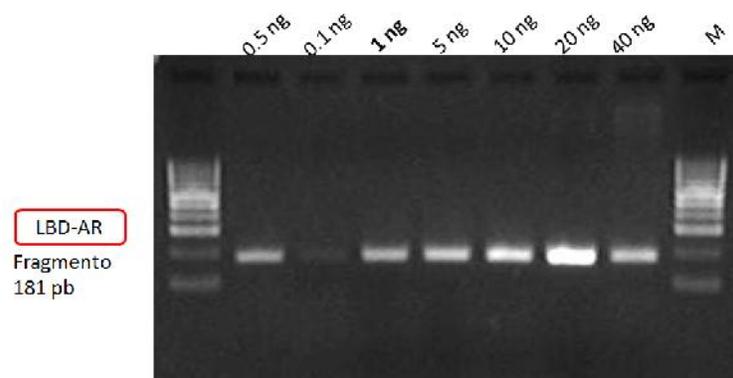
El kit de conversión de ARN a cDNA que utilizamos incluye una prueba de control de calidad, la cual implica la amplificación de un segmento del gen B-actina. Es importante señalar lo anterior, debido a que previo a probar las diferentes cantidades de células en la sangre de donador sano, se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación de los primers diseñados para la amplificación de la región mencionada del AR. que detecta el fragmento correspondiente al LBD, proveniente de la línea celular LNCaP, en donde se encuentra la mutación T878A.

En el caso del primer juego de primers que resultó en un amplicón de 599 pb, se realizó el gradiente de temperatura encontrando la mejor condición de amplificación a los 68.5°C. Posteriormente, el gradiente de amplificación para el segundo par de primers el gradiente de temperatura arrojó que la mejor condición de amplificación fue a los 57°C, tal y como aparece en la figura 18.



**Figura 18. Gradiente de temperatura del programa de PCR para obtener fragmento 181 pb del AR.**

Ahora bien, quisimos probar mediante un gradiente de concentración del templado que tan baja cantidad de cDNA podríamos amplificar. Por ello nuestro gradiente de concentración tuvo un rango de los 0.1 ng hasta los 40 ng de cDNA de la línea celular LNCaP. A continuación, la figura 21 muestra el gel de agarosa al 2% con los resultados de este gradiente. Podemos notar, que por medio de una PCR de punto final, es posible amplificar hasta un nivel de DNA de 0.1 ng.

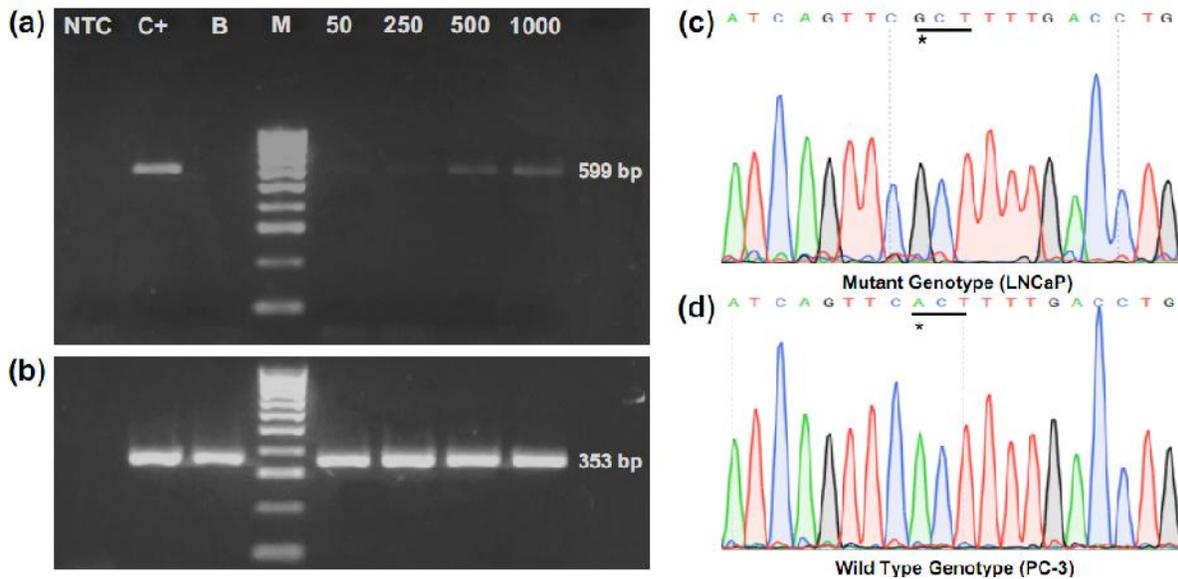


**Figura 19. Gradiente de concentración de cDNA de LNCaP.** Observamos que fue posible amplificar este fragmento del AR en un rango de 0.1-20 ng de DNA obtenido de la extracción.

Teniendo en cuenta los parámetros encontrados, se realizaron los experimentos con las diferentes cantidades de células LNCaP contaminando las muestras de sangre de donadores sanos. A partir de los rangos empleados de entre 15 y 1000 células/mL de sangre, con excepción de la concentración de 15 células/mL, se obtuvo amplificación del fragmento del receptor de andrógenos en todas las demás cantidades evaluadas. Estos resultados se observan en la figura 20 Posteriormente, volvimos a hacer una PCR del producto amplificado de la

muestra con 15 células y al momento de analizarla en el gel de agarosa, pudimos observar amplificación.

Para los experimentos de secuenciación, decidimos utilizar la muestra a la cual se le añadieron 50 células tumorales a los 7.5 mL de sangre, asegurando así tener una proporción de 6 células/mL de sangre analizada. Se purificó el amplicón a partir de la banda observada en la electroforesis y ésta fue secuenciada por electroforesis capilar. El electroferograma observado nos permitió identificar la mutación T878A propia del AR que se encuentra en la línea celular LNCaP. Empleamos como control negativo para la secuencia normal al AR expresado por la línea celular PC-3.



**Figura 20. Análisis de fragmentos del AR y de secuenciación de la región 878**

**pb.** a) Gel de agarosa al 2% con los productos amplificados de 50, 250, 500 y 1000 células/7.5 mL de sangre; b) Controles positivos de amplificación de cDNA: aparece una banda de 353 pb correspondiente a un fragmento del gen B-actina; c)

y d) Electroferogramas obtenidos de la secuenciación: aparecen marcados con un asterisco el cambio de nucleótido de la mutación T878A del AR.

## **5.2 Resultados del objetivo2: Implementar un protocolo clínico piloto para la detección de células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de próstata (fase in vivo).**

Dentro de nuestro protocolo *in vivo*, reclutamos 20 pacientes con CaP de los cuales solamente 8 de ellos cumplieron con nuestros criterios de inclusión. Por otro lado, se analizaron 8 donadores sanos como control.

En esta descripción de los resultados, aparecen primero aquellos relacionados a los controles, ya que a partir de ellos se obtuvo el punto de corte para la tecnología Cytocatch™ para pacientes con CaP metastásico. El rango de edad de los controles analizados fue de 30-58 años. La tabla número 6 contiene los conteos de CTC de los controles incluidos en el estudio.

La media  $\pm$  (SEM) de los controles incluidos fue de  $5 \pm 0.597$  CTC/mL de sangre y una mediana de 5 CTC/mL de sangre (3-8 CTC/mL). Basados en los niveles de CTC encontrados en los hombres sanos, establecimos nuestro punto de corte en 10 CTC/mL de sangre.

Los pacientes considerados para el estudio tuvieron un rango de edad entre 58 y 80 años y fueron pacientes en un estadio metastásico de CaP. El conteo de CTC mostró una media  $\pm$  SEM de  $21 \pm 2.957$  CTC/mL y una mediana de 21 CTC/mL de sangre con rangos de 12-35 CTC/mL de sangre. La tabla 7 resume las

características más sobresalientes de los pacientes tomados en cuenta para los análisis de CTC

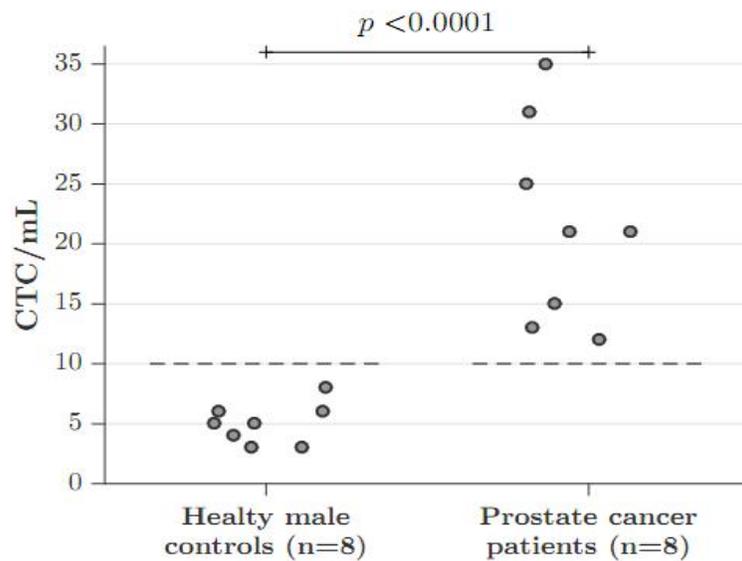
**Tabla 6. Conteos de CTC de los sujetos sanos del estudio.**

<b>Sujeto control</b>	<b>CTC/7.5mL</b>	<b>CTC/mL</b>
1	24	3
2	21	3
3	32	4
4	44	6
5	47	6
6	35	5
7	58	8
8	40	5

**Tabla 7. Características de los pacientes analizados.**

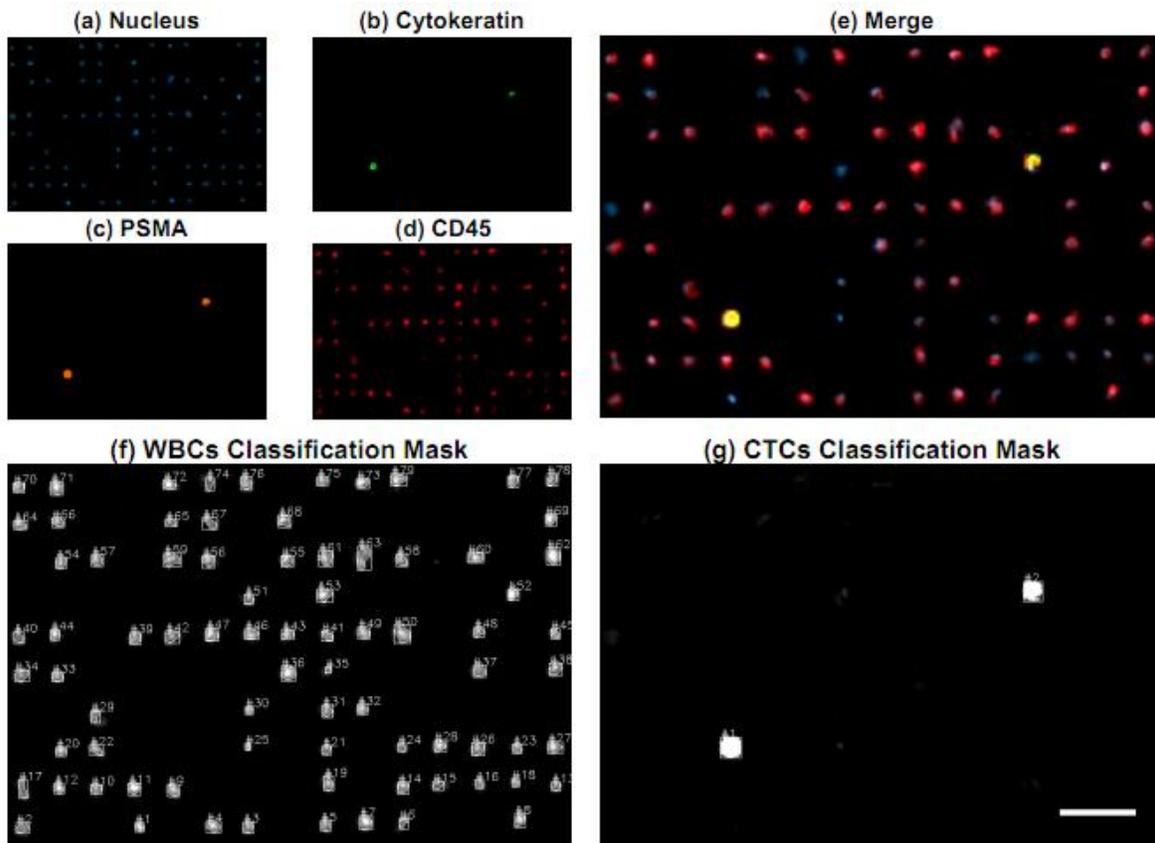
<b>Paciente</b>	<b>CTC/ 7.5mL</b>	<b>PSA ng/mL</b>	<b>CTC/m L</b>	<b>Último PSA ng/mL</b>	<b>Grupo Gleason</b>	<b>Tiempo de evolución (años)</b>	<b>Tratamiento</b>
1	100	1238	13	1238	3	<1	Docetaxel
2	109	1854.2	15	0.04	5	1	Docetaxel, Bicalutamida
3	187	14	25	0.002	1	5	Bicalutamida y Leuprolide
4	158	21.7	21	0.51	5	<1	Bicalutamida, Zometazona y Orquiectomía bilateral
5	93	138.33	12	0.05 (>6M, 1.10)	5	1	Orquiectomía+Esquema Charred+Bicalutamida
6	230	309	31	ND	5	<1	Bicalutamida
7	154	26	21	4.43 (>2M, 0.55)	5	2	Leuproreline, Zytiga
8	266	144	35	3.98 (>2M, 8.5)	5	1	Goserelide y Bicalutamida

Ahora bien, la diferencia de medias analizada entre los casos y controles incluidos en este estudio mostró una marcada diferencia estadísticamente significativa con un valor de  $p < 0.0001$ . Este resultado junto con el punto de corte que tomamos como referencia pueden observarse en la figura 21.



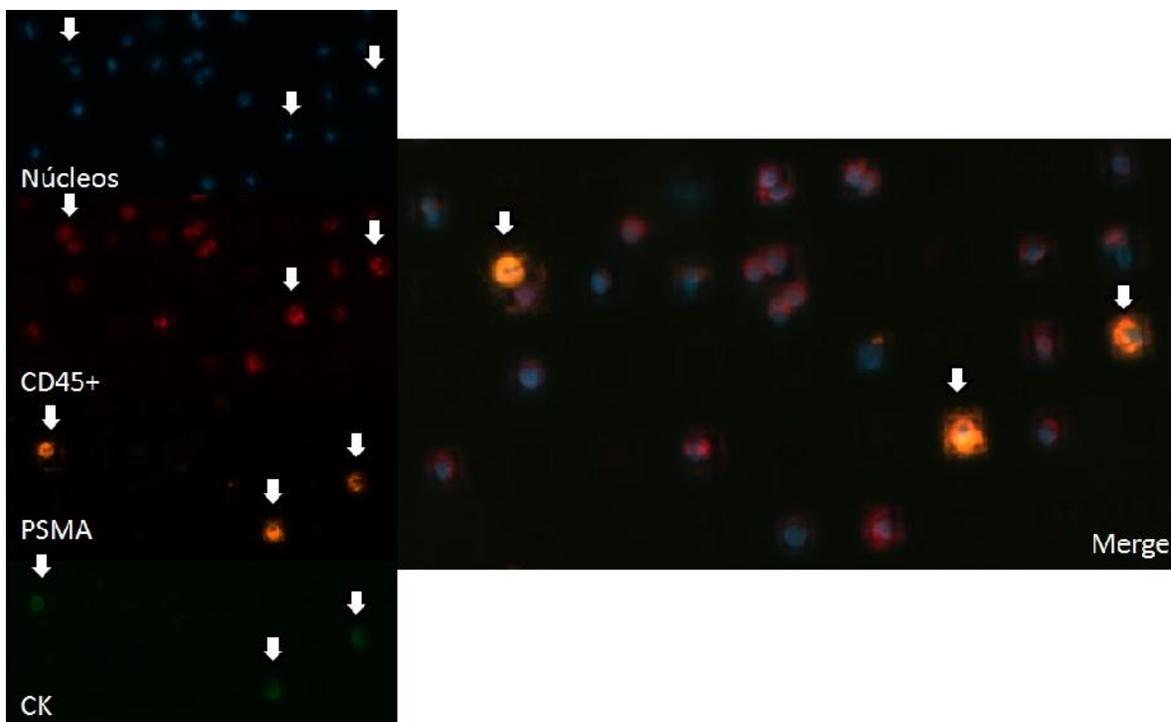
**Figura 21. Enumeración de CTC en ambos grupos de estudio.** Se muestran los niveles de CTC/mL de sangre para cada paciente. Se estableció el punto de corte en 10 CTC/mL y se encontró una diferencia estadística entre ambos grupos con un valor de  $p < 0.0001$ .

La figura 22 se aprecia una imagen representativa de la detección y enumeración de CTC de uno de los pacientes incluidos en el estudio. Podemos observar el marcaje individual que se realizó de las diferentes células y también el *merge* de las mismas, así como el procesamiento que realiza el algoritmo del equipo Cytocatch.



**Figura 22. Identificación de CTC en un paciente y su análisis.** a) Marcaje con DAPI de los núcleos; b) Marcaje de Pan-CK; c) Marcaje PSMA; d) Marcaje CD45; e) *Merge* de los diferentes canales de la membrana, observando las CTCs en color amarillo; f) sistema de reconocimiento de leucocitos; y g) sistema de reconocimiento de CTC.

Finalmente, identificamos células que fueron positivas a los tres marcadores utilizados, es decir, PSMA+, CK+ y CD45+, siendo estas células identificadas como eventos raros. En los pacientes, encontramos  $85 \pm 24$  eventos raros/mL de sangre; mientras que, en los controles fueron hallados en un nivel de  $15 \pm 2$  eventos raros/mL de sangre. La figura 23 muestra una imagen representativa de eventos raros en una muestra de paciente.



**Figura 23. Eventos raros encontrados en las muestras analizadas.**

### **5.3 Resultados del Objetivo 3**

#### **5.3.1 Características clínicas de los casos y controles enrolados en el estudio de genotipificación.**

Para conocer las características de genotipificación y sus potenciales implicaciones clínicas en una muestra de población mexicana, incluimos 201 sujetos de estudio. Los sujetos participantes fueron clasificados como casos de CaP (n=101) y sujetos sin CaP divididos en hombres sin anomalías prostáticas (n=60) y con hiperplasia prostática benigna (HPB, n=40). Para los pacientes con CaP, la mediana (IQR) de edad fue de 70 (64.5-75) años. El treinta por ciento de ellos, tuvo historial de patología prostática; la mediana (IQR) del APE fue de 20.4 (IQR 9.65–62.82). El 20.8% tuvo diabetes mellitus de tipo 2 (DM2) y el

índice de masa corporal (IMC) fue en el 33.7% de los casos con peso normal, el 40.8% con sobrepeso y el 22.4% con algún grado de obesidad. La estadificación Gleason fue realizada de acuerdo a las recomendaciones de la International Society of Urological Pathology (ISUP) (104). Sesenta y dos por ciento de los casos fueron clasificados en el Grupo 5, es decir, tuvieron Gleason Scores de 9 y 10. La mayoría de los pacientes (67%) recibió terapia de deprivación androgénica (ADT), predominantemente compuesta de bicalutamida sola o en combinación con otros fármacos. La tabla 8 muestra en detalle las características clínicas de interés de los pacientes con CaP.

**Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con CaP.**

<b>Características clínicas</b>	<b>Casos afectados n (%)</b>
ISUP Grade Group †	
▪ Grupo 1	2 (2)
▪ Grupo 2	13 (13.3)
▪ Grupo 3	13 (13.3)
▪ Grupo 4	9 (9.2)
▪ Grupo 5	61 (62.2)
Invasión extracapsular (%)	63 (62.4)
Invasión neurocapsular (%)	57 (56.4)
Recurrencia (%)	7 (6.9)
Metastasis (%)	21 (20.8)
Resistencia a la castración (%)	14 (13.9)
Terapia de deprivación androgénica	
▪ Bicalutamida	22 (32.8)

▪ Bicalutamida + leuprolide	9 (13.4)
▪ Bicalutamida + goserelin	11 (16.4)
▪ Bicalutamida+orquiectomía	12 (17.9)
▪ Orquiectomía	6 (8.9)
▪ Otros*	7 (10.4)

---

**Nota:** †Sociedad Internacional de Patólogos Urólogos (ISUP). La ISUP clasifica los grados Gleason en diferentes grupos: Grupo 1: Gleason Score  $\leq 6$ ; Grupo 2: Gleason Score=7(3+4); Grupo 3: Gleason Score=7(4+3); Grupo 4: Gleason Score=8; Grupo 5: Gleason Score=9 and 10. Tratamientos\*: Bicalutamida + leuprolide + orquiectomía, goserelin + leuprolide, ácidozolendrónico + leuprolide, goserelin, orquiectomía + docetaxel, and leuprolide + goserelin + ketoconazol + prednisona.

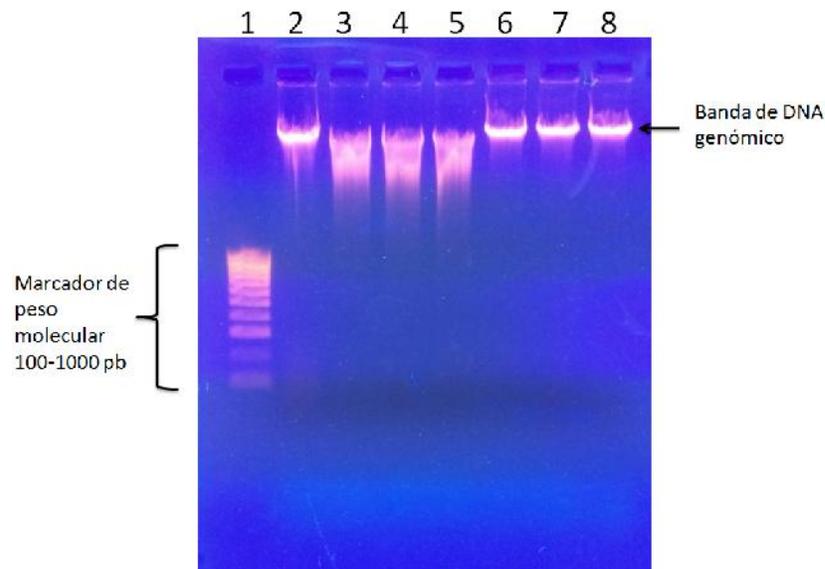
Para los sujetos sin enfermedad tumoral maligna, la mediana (IQR) de edad fue de 58.8 (48-67) años; el 42.4% tuvo historial de patología prostática, en donde la mediana de PSA (IQR) para aquellos hombres con HPB fue de 8.55 (5.12-17.71) ng/mL. El 9% de los sujetos tuvo DM2, y la distribución de los valores de IMC para controles fue de 23.1% de sujetos con peso normal, 44.9% con sobrepeso y el 32.1% restante tuvieron algún grado de obesidad.

La tabla 9 engloba la información relevante de los pacientes con CaP y los sujetos sin enfermedad tumoral maligna. Interesantemente, encontramos una relación significativa entre los casos de CaP y la exposición a biomasa (P-

value=0.012, OR=2.89, CI=1.21-6.88) y el hábito de fumar (P-value=0.028, OR=1.88, CI=1.07-3.31), esto comparado con el grupo control.

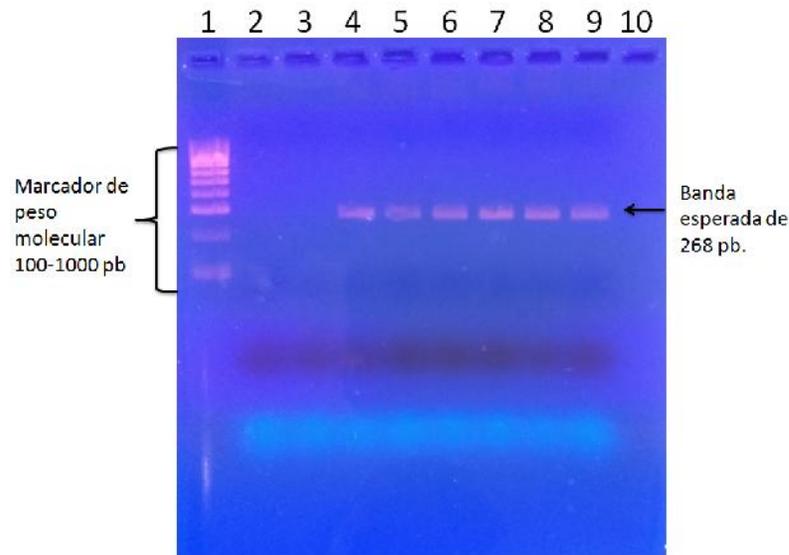
### 5.3.2 Análisis de la calidad del ADN obtenido

El ADN obtenido fue cuantificado debidamente y se prepararon diluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. La figura 24 muestra un gel de electroforesis realizado para observar la integridad del ADN extraído.



**Figura 24. Análisis de la integridad del ADN.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde los carriles 1: Marcador de peso molecular 100-1000 pb, 2: Control de ADN genómico, 3-5: alícuotas de la muestra número 61, 6-8: alícuotas de la muestra 150. Se emplearon 500  $\mu$ g de ADN.

Por otro lado, las muestras que incluimos en esta parte del trabajo fueron amplificadas como otro control de calidad utilizando primers dirigidos a un fragmento del gen de la  $\beta$ -globina. Algunos resultados representativos aparecen en la figura 25.



**Figura 25. Amplificación del gen  $\beta$ -globina.** Gel de agarosa al 2% en donde los carriles 1= marcador de peso molecular de 100-1000 pb, 2-3=controles negativos de amplificación, 4=control positivo de amplificación, 5-9= muestras de pacientes con cáncer de próstata. El producto amplificado esperado es de 268 pb.

### 5.3.3 Genotipificación

La tabla 10 muestra el análisis del HWE para los casos y controles incluidos en el estudio, así como también se muestran las frecuencias genotípicas. La variante A49T se encontró fuera del HWE in la población analizada, no así la V89L que se mantuvo dentro del HWE.

Los resultados del análisis de asociación fueron categorizados de acuerdo con el método usado. En nuestro estudio, el análisis estuvo enfocado a los modelos de dominancia y recesividad genética. Bajo ninguna de las condiciones fue encontrada una asociación entre los modelos aplicados y el desarrollo de CaP (variante A49T) o el conferir efecto protector contra el CaP (variante V89L). La

tabla 11 muestra los resultados obtenidos para ambas variantes genéticas después de llevar a cabo el análisis estadístico utilizando los modelos genéticos de dominancia y recesividad, así como sus respectivos OR (95% de rango de IC).

#### **5.3.4 Asociación de características clínicas y genéticas**

El análisis entre las características clínicas y genéticas fue realizado utilizando los genotipos de V89L y se observa en la tabla 12. No encontramos asociación entre las variables de genotipificación y el PSA, ISUP Grade Group o el historial previo de HPB. Sin embargo, encontramos una relación entre rs523349 con la exposición a biomasa (P-value=0.013, OR=3.17, CI=1.23-8.17) y el alelo G en el contexto del riesgo, y OR=0.32, CI=0.12-0.81 para el alelo C en el contexto del efecto protector utilizando el modelo de dominancia genética. Además, existe una tendencia entre la variante V89L y los pacientes con enfermedad metastásica (ValVal vs LeuLeu + ValLeu, P-value= 0.048, OR = 0.390, CI=0.142-1.073).

**Tabla 9. Características demográficas de los pacientes con CaP y los sujetos control. .**

<b>Característicademográfica</b>	<b>Casos de CaP n=101</b>	<b>Controles n=100</b>	<b>P-value</b>	<b>OR (95% CI)</b>
Mediana de edad, años (IQR)	70 (64.5-75)	58.8 (48-67)	9.22 x 10 <sup>-15</sup>	1.13 (1.08-1.17)
Mediana de PSA ng/mL (IQR)	20.4 (IQR 9.65–62.82)	8.55 (IQR 5.12 – 17.71)	8.29 x 10 <sup>-20</sup>	1.11 (1.07-1.16)
Media de IMC kg/m2, (DS)	27.02 (±4.33)	27.84 (±5.52)	0.271	NS
• <18.5 (% bajo peso)	3.1	0.0	ND	NS
• 18.5-24.9(% peso normal)	33.7	23.1	0.612	NS
• 25-29.9 (Sobrepeso)	40.8	44.9	0.226	NS
• >30 (Obesidad)	22.4	32.1	0.486	NS
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	20.8	21.0	0.732	NS
Hipertensión arterial (%)	38.6	33.0	0.694	NS
Ingesta de alcohol (%)	57.4	64.0	0.182	NS
Hábito de fumar (%)	60.4	43.0	0.028	1.88 (1.07-3.31)
Exposición a biomasa (%)	20.8	8.0	0.012	2.89 (1.21-6.88)
Historial familiar de CaP (%)	18.8	12.0	0.224	NS
Historial familiar de otro cáncer (%)	33.7	29.0	0.603	NS

ND, no disponible; NS, no significativo. P<0.05 indica una diferencia estadística significativa. IC, intervalo de confianza; OR, odds ratio.

**Table10. Equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencias genotípicas de A49T (rs9282858) y V89L (rs523349) en casos y controles.**

Variante	Alelos de Reference	P de Fisher-HWE		Frecuencia genotípica	
		Casos	Controles	Casos (%)	Controles (%)
A49T (rs9282858)	[C/T]	1.90E-06	0.005	T T: 0.030 (3)	T T: 0.010 (1)
				C C: 0.970 (98)	C C: 0.990 (97)
V89L (rs523349)	[C/G]	0.678	0.999	C C: 0.376 (38)	C C: 0.448 (44)
				C G: 0.455 (46)	C G: 0.439 (43)
				G G: 0.168 (17)	G G: 0.112 (11)

Para los alelos de referencia y frecuencias genotípicas: G: guanina, T: timina, C: citosina

**Tabla 11. Análisis de asociación de las variantes A49T (rs9282858) y V89L (rs523349).**

Variante	Modelo Genético	X <sup>2</sup> FDR	OR (95% IC)		Frecuencia alélica*	
					Casos	Controles
A49T (rs9282858)	Dominante	0.327	T 2.97 (0.30-29.05)	C 0.34 (0.03-3.29)	T 0.03	T 0.01
	Recesivo	0.327	T 2.97 (0.30-29.05)	C 0.34 (0.03-3.29)	C 0.97	C 0.99
V89L (rs523349)	Dominante	0.594	G 1.35 (0.77-2.38)	C 0.74 (0.42-1.30)	G 0.396	G 0.332
	Recesivo	0.511	G 1.60 (0.71-3.62)	C 0.62 (0.28-1.41)	C 0.604	C 0.668

\*Para las frecuencias alélicas: G: guanina, T: timina, C: citosina.

X<sup>2</sup>, Xi cuadrada; FDR, False Discovery Rate; OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

**Tabla 12. Análisis de los genotipos de rs523349 (V89L) y variables clínicas.**

Genotipo	PSA		Grade Gleason Group ISUP classification			Metástasis		Hiperplasiaprostática benigna	
	Mediana ng/mL	Valor P	<3	> 4	Valor P	%	Valor P	%	Valor P
VV	48.46		14.28	23.47		3.96		20.60	
VL	47.53	0.684	33.67	12.24	0.071	13.86	0.492	18.50	0.282
LL	53.22		14.28	2.04		2.97		3.30	
VV+VL	51.07	0.655	26.50	57.10	0.125	17.82	0.766	39.10	0.3040
LL	47.53		2.04	14.30		2.97		3.30	
VV	51.75	0.134	14.30	47.90	0.125	3.96	<b>0.048</b>	20.60	0.635
LL+VL	48.46		14.30	23.50		16.83		21.70	

International Society of Urological Pathology (ISUP) Grade Group †: Grupo 1:Gleason Score < 6; Grupo 2:Gleason Score=7(3+4); Grupo 3:Gleason Score=7(4+3); Grupo 4:Gleason Score=8; Grupo 5: Gleason Score= 9 and 10; VV: val/val; VL: val/leu; LL: leu/leu.

## CAPÍTULO 6

### Discusión

#### 6.1 Objetivos 1 y 2.

La búsqueda de biomarcadores tumorales es uno de los principales retos entre los grupos de investigación en cáncer. El uso de biopsias líquidas se ha extendido por los Estados Unidos de América y por Europa. En América Latina, hay una falta de estudios en este campo que permitan a los médicos establecer mejores panoramas de las diferentes enfermedades tumorales.

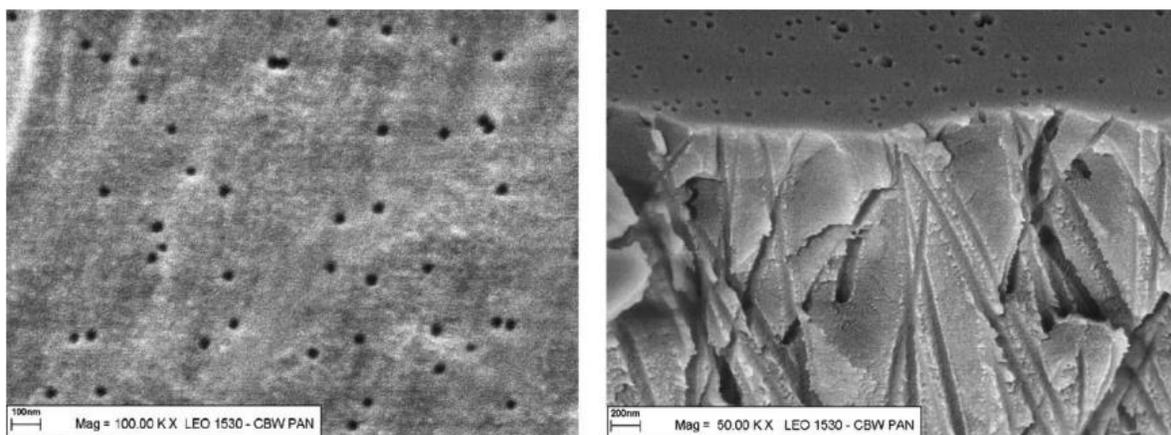
En nuestro caso, la CTCs aparecen como biomarcadores prometedores en cáncer de próstata. La tecnología que hemos estandarizado no sólo permite su conteo, sino también establece potenciales escenarios para una futura caracterización molecular empleando la plataforma de microfiltración Cytocatch®.

Es importante remarcar que en el estudio de CTCs, algunos de los aspectos más importantes a tomar en cuenta, es contar con un método de detección con una alta eficiencia de captura, con marcadores que le otorguen especificidad a la separación y con un enriquecimiento suficiente para eliminar la cantidad de leucocitos que potencialmente pudieran contaminar la separación celular.

En general, los filtros poseen buenos resultados en términos de eficiencia de captura y pureza en los procesos de separación y enriquecimiento celular. Sin embargo, la elección del método de microfabricación de las membranas de filtración celular es crucial para obtener una determinada distribución y geometría

de poros a lo largo del material que se seleccione como sustrato para su elaboración.

Por un lado, existen aquellos microdispositivos de separación celular basados en métodos de fabricación denominados como **Track-etch membranes (TEMs)** los cuales suelen fabricarse con un material conocido como policarbonato. Este método de microfabricación provee resultados de membranas de microfiltración con poros cilíndricos distribuidos de manera azarosa a lo largo de la superficie de la membrana, hecho que promueve variables eficiencias de captura en las separaciones celulares derivados de flujos caóticos que pudieran generarse al momento del paso de la muestra. Los **TEMs** promueven la formación de poros a partir de la irradiación del sustrato con iones radioactivos, por ejemplo, aquellos donde se utilizan iones de Kriptón a cierta energía y ángulo de irradiación. La figura 26 muestra una membrana elaborada bajo esta técnica de microfabricación (105).

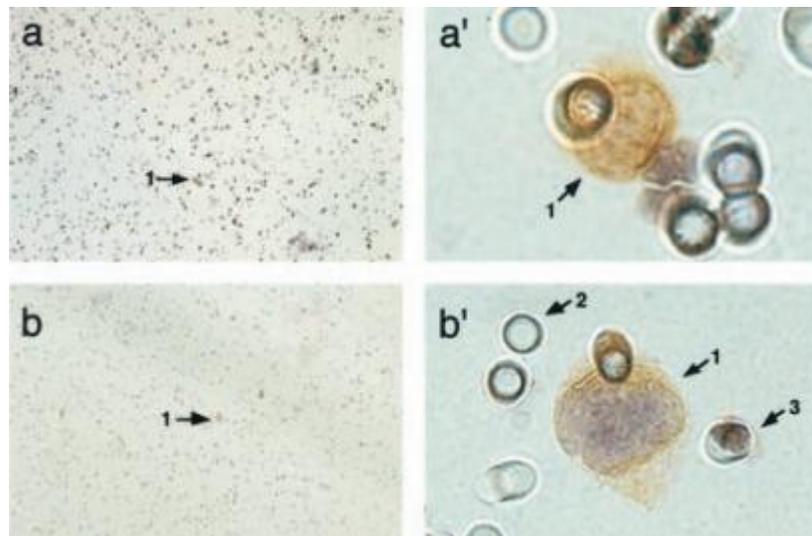


**Figura 26. Estructura de policarbonato de una membrana de filtración.**

Podemos observar como resultado de esta técnica como se obtienen poros distribuidos de manera azarosa y algunas microfracturas que se forman en la misma.

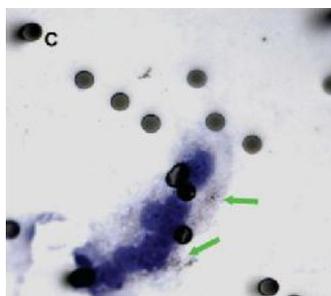
Dos de los principales dispositivos fabricados bajo este principio, son el ISET® technology de Rarecell (París, Francia) y el ScreenCell® (Sarcelles, Francia).

El ISET está compuesto de una membrana con poros cilíndricos de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro y cada muestra es filtrada a lo largo de una superficie de 0.6 cm de diámetro (106); la figura 27 muestra una observación al microscopio en campo claro de la aparición de células tumorales de dos líneas celulares a diferentes magnificaciones. El dispositivo ISET ha reportado una eficiencia de captura de hasta el 78.8% en células contaminantes de donador sano (107).



**Figura 27. Observación de células tumorales en la membrana ISET.** Se observan las líneas celulares MCF7 (a, a') y LNCaP (b, b'). Magnificaciones en 10X (a y b) y 100X (a', b'). En la figura b', los autores muestran la observación de los poros de la membrana de filtración (flecha 2).

Más recientemente la compañía ScreenCell® (Paris, Francia) desarrolló 3 filtros para el análisis de CTCs: 1) ScreenCell® Cyto para el aislamiento y enumeración de CTCs; 2) CC Filtration Unit para cultivo celular de las CTCs aisladas; y 3) ScreenCell® MB-LC Filtration Unit para análisis moleculares. Para este dispositivo se reportaron las eficiencias de captura empleando la línea celular H2030; los autores emplearon 5 y 2 células en una serie de repeticiones encontrando una eficiencia de captura promedio del 91.2% y 74%, respectivamente; la figura 28 muestra una observación de células tumorales empleando el ScreenCell® Cyto(108).



**Figura 28. Observación de células tumorales en la membrana ScreeCell.** Tinción de hematoxilina y eosina a 40X; se observan los poros del proceso de fabricación y CTCs de un paciente con cáncer de colon.

A diferencia de los TEMs, existen otros métodos de elaboración de filtros cuyo fundamento permite la obtención de membranas de alta porosidad, con poros de tamaño y distribución homogénea a lo largo de la superficie del sustrato. Estas técnicas se conocen como **técnicas de microfabricación de membranas** y se basan en el uso de una oblea de silicio sobre el cual se hace un grabado (**etch**) con distintos materiales como parileno, silicón, SU8 o iones metálicos (109).

Lin y colaboradores 2010 desarrollaron un microdispositivo fabricado a partir de parileno, el cual consiste en una membrana de filtración que espacialmente es colocada entre dos losas de PDMS sujetas por plantillas de acrílico. Al microdispositivo se le unen unas jeringas de entrada y de salida. Los poros se encuentran unidos a lo largo de su superficie y estos fueron diseñados para tener un tamaño de 8  $\mu\text{m}$  (110). En la estandarización de este dispositivo, encontraron que tienen una eficiencia de captura superior al 88% y con un tiempo de separación de muestra de 17 mL/min (111).

Xu y colaboradores (2010) caracterizaron una membrana de microfiltración elaborada con Parylene C con una superficie de 30,401 poros disponibles para el enriquecimiento de las muestras. Sus procesos de estandarización resultaron en una eficiencia de captura de hasta un 90% empleando la línea celular PC3 a un flujo de 0.2 mL/min. Para sus experimentos, ellos utilizaron 1 mL de sangre completa, por lo que en procesar una muestra de sangre completa (7.5) les llevaría un tiempo superior a los 35 minutos (112).

En relación a los fundamentos de separación celular, a diferencia del mecanismo de separación utilizado por el CellSearch®, emplear un sistema de separación independiente a utilizar marcadores celulares, ofrece la ventaja de lograr eficiencias de captura más altas. En nuestro caso, Cytocatch™ se fundamenta en la separación de CTCs bajo el principio de tamaño y deformabilidad de las mismas.

Las membranas de filtración utilizadas fueron elaboradas a partir de una metodología de microfabricación que se conoce como electroformado de níquel. El uso de membranas metálicas elaboradas bajo este concepto, permite obtener membranas de filtración con geometría, tamaño, cantidad y homogeneidad de los poros con alto control en donde éstas pueden exceder una porosidad del 2% de su superficie sin tener problemas de superposición de poros (113, 114); además, la concepción de membranas microfabricadas con elementos metálicos son recomendadas para usos diagnósticos y de investigación en áreas biológicas, ya que son inertes a los materiales que suelen utilizarse para las separaciones y compatibles para cuestiones de cultivo celular (115); su proceso de elaboración implica el uso de hojas semilla (iniciadoras de la reacción), las cuales son fotoresistentes y en donde inicia la adhesión de capas de resinas químicas que contienen los compuestos necesarios para el agregado de los elementos que compongan la membrana porosa, en nuestro caso fue el níquel (114).

Como resultado de este proceso, obtuvimos tres membranas de níquel con las características deseables para los poros disponibles para la separación. Empleamos para la separación de los pacientes una membrana de 7  $\mu\text{m}$  que contiene 110,440 poros cuadrados, correspondiendo a una porosidad del 8.5%.

Previamente, Hozokawa y cols. desarrollaron una membrana de filtración metálica en la que obtuvieron eficiencias de captura hasta del 97% para células de cáncer de pulmón utilizando la línea celular NCI-H358. Ellos emplearon un arreglo de microcavidades distribuidas en una separación de 60  $\mu\text{m}$  en un arreglo de 100

x 100 cavidades dando un total de 10,000. Usaron 4 tamaños de poro 8 – 11  $\mu\text{m}$  (116).

La caracterización de la plataforma Cytocatch™ mostró una capacidad de procesamiento de muestras de sangre completa a un nivel de 7.5 mL de sangre en un tiempo menor a 12 minutos. Este resultado fue posible gracias a la estandarización de los experimentos entre los tres diferentes tamaños de poro y dos velocidades de flujo. Los resultados óptimos de separación fueron obtenidos a un tamaño de poro de 7  $\mu\text{m}$ , con una velocidad de flujo de 2 mL/min en donde se obtuvieron una eficiencia de captura del 98% y una pureza 0.29% correspondiendo a  $4144 \pm 315$  eventos nucleados y empleando la línea celular PC-3. Si bien es una pureza más baja comparada con los otros tamaños de poro de las membranas de filtración, esta cantidad de eventos nucleados no son un impedimento para la identificación de las CTC ya que utilizamos anticuerpos específicos para diferenciarlas de los leucocitos presentes en la membrana. Además, estos valores de pureza se mantuvieron a este nivel debido a que las muestras fueron prefijadas antes del proceso de separación, hecho que le proporciona cierto grado de rigidez a las membranas celulares y se reflejó en un conteo de  $345 \pm 17$  células/mL; sin embargo, se decidió continuar con el prefijado de las muestras ya que de no hacerlo se corre el riesgo de perder CTCs de los pacientes analizados.

Este aspecto de cuidar el prefijado de muestras previo al método de separación ya ha arrojado resultados de cambios en la eficiencia de captura de las muestras; Adams y colaboradores realizaron experimentos para determinar este

efecto cuyos resultados sobre líneas celulares LNCaP y PC-3 mostraron que la eficiencia de captura decae por debajo del 85%. Además, hay que recordar que la prefijación permite mantener cierta rigidez en las membranas celulares, por lo que células de tamaños cercanos al del poro podrían tener mayores posibilidades de retenerse (117).

Por otro lado, se ha reportado que existen diferencias pequeñas entre los tamaños de las células tumorales entre las diferentes líneas celulares (118). Esta fue la razón por la cual utilizamos también las líneas celulares LNCaP, VcaP y DU-145 para la caracterización de nuestro dispositivo, sin encontrar diferencias importantes en la eficiencia de captura, la cual rondó entre el 93%-99% en los experimentos desarrollados, bajo las condiciones de tamaño de poro y flujo seleccionados.

Basados en este punto de referencia, nuestros experimentos de caracterización fueron realizados a partir de 7.5 mL de sangre completa para emular las condiciones de separación del estándar de oro. A diferencia nuestra, el CellSearch tuvo eficiencias de captura entre el 85%-122% de las células en las muestras contaminadas; en uno de sus primeros estudios, incluyeron una cohorte de 123 pacientes de CaP en donde en al menos el 57% de ellos encontraron un número  $\geq 2$  CTCs/mL, 41%  $\geq 5$  CTCs/mL, 32%  $\geq 10$  CTCs/mL y 14%  $\geq 50$  CTCs/mL(119).

Nuestros experimentos de cuantificación de CTCs en donadores sanos mostraron que estos tuvieron en promedio 5 CTCs/mL (3 – 8 CTCs/mL) de sangre.

Este rango nos permitió determinar el *threshold* de nuestra tecnología en 10 CTCs/mL de sangre. A nuestro conocimiento, la tecnología desarrollada por Stott y cols. conocida como CTC-Chip colocó su *threshold* en 12 CTCs/mL debido a que en sus resultados el rango superior en el que encontraron CTCs en sujetos sanos fue de 12 CTCs/mL (120). Este mismo grupo de trabajo, desarrolló el microdispositivo conocido como Herringbone-Chip, en donde también encontraron CTCs en sujetos sanos en un rango de 0 a 3 CTCs/mL de sangre (121). Hasta este punto, diversos autores en la literatura han encontrado controversial la detección de CTCs en sujetos sanos, de hecho, Stott la define como “eventos raros” o “falsos positivos”; sin embargo, decidimos apegarnos al término de CTC dada su definición.

Por otro lado, sugerimos que el encontrar CTCs en sujetos sanos puede estar asociado a dos razones: 1) El fundamento de la técnica de separación: al ser una técnica de separación independiente de anticuerpos, CTCs con diferentes genotipos son capturadas y cuantificadas bajo la definición que proponemos en este trabajo como célula tumoral. 2) La interacción que existe entre la formación de CTCs de distintos orígenes y las condiciones de flujo a través del riego sanguíneo y el microambiente del sistema inmunológico.

En primera instancia, tanto el estándar de oro para la separación y enumeración de CTCs así como para otros dispositivos que se han desarrollado para el análisis de las mismas, siguen un principio de separación basado en la expresión de EpCAM. En estos casos, los autores presentan resultados en donde no encontraron CTCs en las muestras analizadas de sujetos sanos (93, 122, 123).

En primera instancia, se ha demostrado que las CTCs sufren una rápida muerte dentro del flujo sanguíneo; Fidler determinó en experimentos llevados a cabo en ratones C57BL/6, a los cuales les administró un inóculo de 200,000 células, que el 99% de ellas muere durante las primeras 24 horas dentro del torrente sanguíneo; en otras palabras hablamos que para el desarrollo de micrometástasis en su modelo necesitó al menos 2000 células (el 1% vivo a las 24 horas) que sobrevivieran a las condiciones del organismo (124). Este decremento en la carga celular disponible para originar metástasis tumorales podría estar relacionado con la inmunocompetencia de los individuos sanos, más específicamente por los niveles de linfocitos NK y su capacidad para eliminar los llamados embolos de CTCs (125).

Por otro lado, las CTCs también son susceptibles a las condiciones del entorno de los vasos sanguíneos. Dichas condiciones contemplan aspectos como la resistencia a introducirse en la vasculatura de los diferentes órganos, el atrapamiento en ellos una vez que se han introducido, así como el tiempo de vida que tienen en la circulación (126, 127).

Nuestros resultados en pacientes mostraron que nuestra tecnología es capaz de discernir entre niveles de CTCs presentes en sujetos sanos y casos de CaP metastásico. Recordemos que nuestros criterios de clasificación de CTCs fueron células nucleadas CK+/PSMA+/CD45-; CK-/PSMA+/CD45-; y CK+/PSMA-/CD45-. Alrededor del 80% de las CTCs aisladas en este estudio, mostraron una expresión de ambos anticuerpos dirigidos hacia ellas. Observamos también que los niveles de CTCs son independientes de otras variables clínicas tales como

nivel de PSA, por ejemplo, el paciente número tres al momento de la toma de muestra para el estudio de separación celular reportó un nivel de PSA de 0.002 ng/mL y conteo de 25 CTCs/mL, valor superior a la media (21 CTCs/mL). Este paciente fue reportado clínicamente como respondedor y cuyo tratamiento consistió en bicalutamida+leuprolina. El tener un conteo de CTCs de este nivel, podría sugerir la presencia de enfermedad tumoral en progresión. A su vez, este paciente resultó con un Grupo Gleason 1 (Gleason 6).

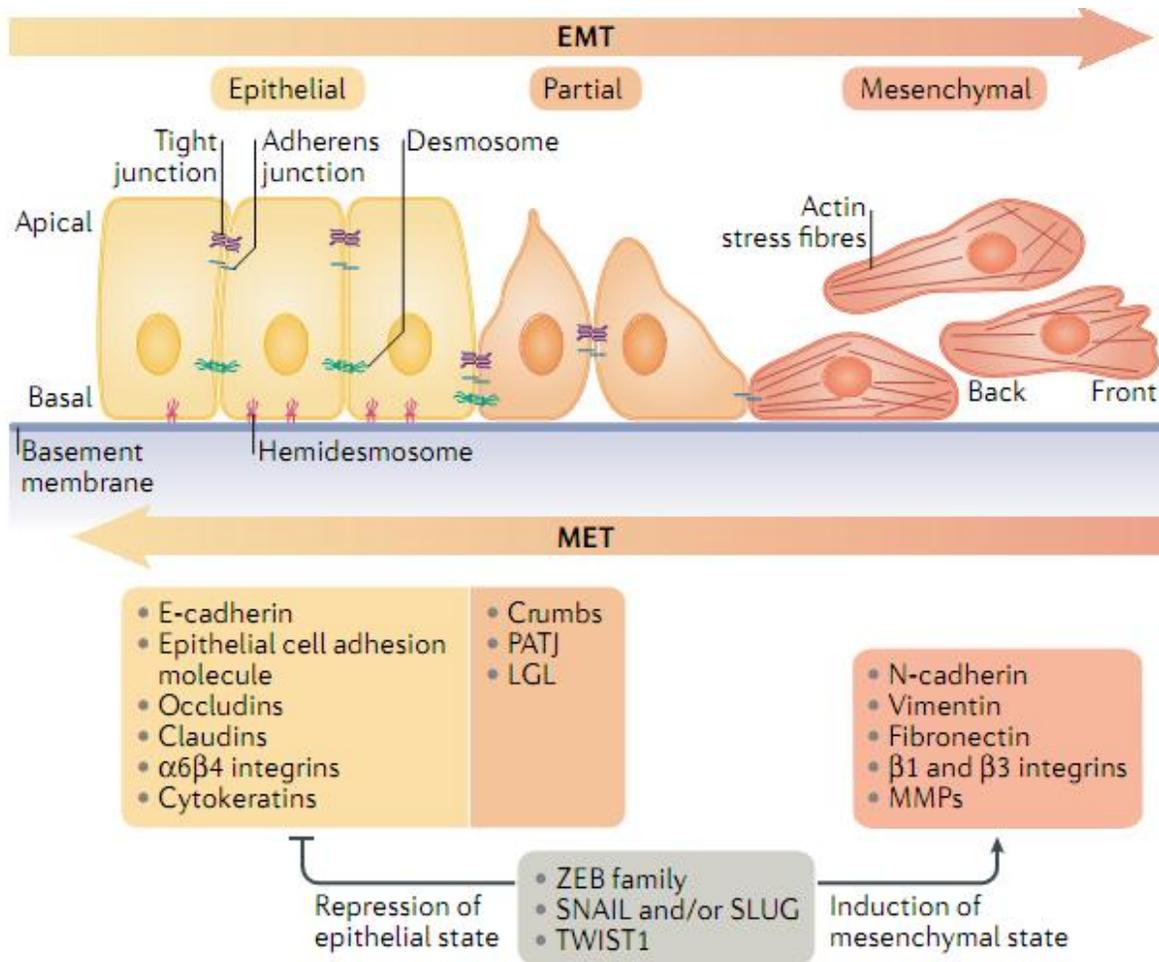
El CellSearch reporta que en sujetos normales se ha encontrado al menos una CTC/mL y bajo condiciones de enfermedad benigna, se encontró que en 10/295 sujetos sanos fue detectada al menos 1 CTC/mL, mientras que en 19/255 pacientes con enfermedad benigna se encontró al menos 1 CTC/mL, 1/255 tuvieron al menos 5 CTC/mL y 10 CTC/mL. Específicamente hablando de sujetos con CaP metastásico, dicha tecnología reportó que 218 pacientes incluidos los porcentajes de pacientes, 77.5%, 57.3%, 45.0%, 20.6%, 13.8%, 3.7% y 2.3% tuvieron conteos de CTCs/mL de sangre de  $\geq 1$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 10$ ,  $\geq 50$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 500$ ,  $\geq 1000$  distribuidos en 7.5 mL de sangre completa analizada (91). En cualquiera que sea el caso, estas separaciones celulares fueron realizadas previo a la administración de una nueva línea de tratamiento antitumoral.

Estudios posteriores determinaron la utilidad clínica el *threshold* en relación a la sobrevivencia promedio de pacientes con CaP metastásico, encontrando dos escenarios posibles. Se determinó que aquellos pacientes con un nivel  $\geq 5$  CTCs/mL de sangre viven en promedio 11.5 meses contrastando con aquellos cuyo conteo de CTCs estuvo por debajo de este nivel, quienes vivieron en

promedio 21.7 meses. En este mismo estudio, se les otorgó un seguimiento a los pacientes para observar si este escenario probabilístico se mantuvo y encontraron que aquellos pacientes con un conteo  $\geq 5$  CTCs/mL cambiaron su panorama de sobrevivencia promedio a 9.5 meses (128).

Para nuestro estudio decidimos prescindir del etiquetado de las células con EPCaM debido a que las CTCs son células que se encuentran en plena Transición Epitelial Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés). Este proceso implica una serie de cambios morfológicos y de funciones celulares mediadas por la expresión diferencial de diferentes genes. La figura 29 muestra un panorama general que ocurre en este proceso. Existen tres tipos de EMT, una observada durante el desarrollo embrionario, otra durante la cicatrización de heridas y regeneración de tejidos y uno más que ocurre durante el desarrollo tumoral que da origen a las metástasis (129).

Las CTCs, al ser de estirpe epitelial, exhiben la expresión característica de proteínas como EpCAM, E-Cadherina y CKs. Una disminución en la expresión de las dos primeras, ocurre junto a estos cambios morfológicos en los que las células pierden su apariencia poligonal con bordes redondeados, las cuales están unidas a través de uniones oclusivas, adherentes y desmosomas. A su vez la sobreexpresión de proteínas N-cadherina, fibronectina y vimentina, acompañadas de una apariencia de células en huso, el cual es típico de los fenotipos mesenquimales (130).



**Figura 29. Vista típica de la transición epitelial mesenquimal en cáncer.**

Se ha demostrado en tecnologías de separación basadas en tamaño, como aquella conocida como Parsortix, la cual es un sistema de microfiltración en tres dimensiones y cuyos autores emplearon para identificar CTCs provenientes de CaP metastásico, así como una comparación el CellSearch®. Ellos observaron que la plataforma Parsortix logró aislar hasta un 55% de células PC-3, mientras que el CellSearch® aisló hasta un 40% de esta misma línea celular que es bien sabido tiene una expresión media de EpCAM (118). Este hallazgo fue relacionado con un reporte previo del mismo grupo de investigación, en el que a través de

experimentos de RT-qPCR compararon la expresión de EpCAM de las líneas celulares MDA-MB-231 (cáncer de mama, baja expresión de EpCAM), PC-3 (expresión media de EpCAM) y SKBR3 (expresión alta de EpCAM); los resultados mostraron que aquellos dispositivos que basaron la separación de CTCs en la expresión de EpCAM, sólo tuvieron porcentajes de recuperación de CTCs-EpCAM+ en porcentajes del 40% (PC-3) y del 12% (MDA-MB-231) (131).

En este mismo sentido, Green y colaboradores demostraron que existe una expresión variable de EpCAM entre las CTCs aisladas de pacientes con CaP. Este grupo de investigación desarrolló un dispositivo microfluídico con dos zonas de atrapamiento celular funcionalizadas la primera para atrapar células que expresen altos niveles de EpCAM (zona 1) y la segunda bajos niveles de esta proteína, pero funcionalizadas para el atrapamiento dependiente de CTCs con expresión de N-Cadherina. Los resultados de caracterización con líneas celulares mostraron que la línea celular LNCaP (EpCAM+) fue atrapada con una eficiencia de captura de hasta el 90%; mientras que, la línea celular PC-3 se observó con un atrapamiento de hasta un 80%. Además, los experimentos realizados en pacientes, mostraron que aquellos sujetos cuyas CTCs tenían una baja expresión de EpCAM se relacionaron con tumores más agresivos y de rápida progresión (122).

Debido a lo evidencia anterior, no consideramos el etiquetado de las CTCs aisladas de los pacientes con CaP metastásico. Decidimos analizar la expresión del Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA, expresado por el gen *FOLH1*). Se ha demostrado que hasta el 93.9% de tejidos tumorales con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma de próstata sostienen una

expresión de PSMA (132); por otro lado se ha reportado que el PSMA está relacionado a un incremento en el riesgo de recurrencia bioquímica medida a través de los niveles de PSA (133); A su vez, el PSMA se ha propuesto utilizar como un blanco terapéutico dirigido, al acoplarse al radionúclido compuesto de Lu-PSMA-617 para el tratamiento de CaP localizado, teniendo una respuesta favorable en el 70% de los pacientes tratados (134).

Previamente, se han realizado aproximaciones interesantes en el área de investigación de CTCs para realizar el aislamiento de las mismas de pacientes con CaP. Uno de los casos de mayor éxito es el reportado por Kirby y colaboradores; en su estudio, los autores desarrollaron, caracterizaron y probaron en un estudio clínico el dispositivo GEDI (Geometrically Enhanced Differential Immunocapture). Los autores diseñaron un microdispositivo compuesto de una serie de postes funcionalizados con anticuerpos dirigidos contra PSMA para realizar la separación de las CTCs y realizar una posterior caracterización con anticuerpos dirigidos contra EpCAM (para verificar su identidad epitelial) y CD45 (135).

El encontrar eventos raros, los cuales fueron fluorescentes con todas las señales positivas, es decir, células nucleadas PSMA+/CK+/CD45+ fue un hallazgo importante. Observamos que en los pacientes que incluimos en el estudio fueron encontrados en promedio  $85 \pm 24$  eventos raros/mL de sangre, mientras que para los controles, estos fueron encontrados en un nivel promedio de  $15 \pm 2$  eventos raros/mL de sangre. Tal y como se ha visto, es bien sabido que existen diferentes subtipos de CTCs entre las diferentes enfermedades tumorales como las de próstata o mama (120, 136). Al igual que en cáncer de próstata, otros autores han

reportado la existencia de CTCs con estos fenotipos no tradicionales entre los cuales destaca la presencia de eventos raros que expresan los marcadores típicos de CTCs y además expresan positividad al marcaje de CD45.

Se han realizado algunos esfuerzos por conocer la naturaleza de estas células raras que expresan positividad a CD45. Algunas sugerencias que se han hecho entorno a su origen es que podrían ser macrófagos, ya que de manera intencionada se han realizado tinciones dirigidas al marcador de macrófagos CD68 (136, 137). Basados en este argumento, una de las hipótesis que podría explicar la aparición de estos eventos raros es que algunas CTCs de los pacientes analizados podrían haber sido fagocitadas durante su proceso de intravasación al torrente sanguíneo.

Otra hipótesis sugiere un origen de estos eventos raros en una supoblación celular de origen mieloide CD14+, CD11c+, CD45+ conocida como ***cancer-associated macrophage-like cells (CAMLs)***, las cuales tienen el potencial de expresar proteínas de tipo epitelial como EpCAM, CK8, CK18 y CK19 (138-140). Derivado de esta evidencia se sugiere que estos eventos raros encontrados podrían deberse a que estas CAMLs engullen CTCs o bien restos celulares de las mismas y es por ello que se aprecia positividad al marcaje con los diferentes anticuerpos para su identificación.

Finalmente, logramos demostrar que nuestra plataforma de análisis tiene el potencial de servir como punto de partida para la realización de pruebas de caracterización molecular de las CTCs aisladas. Nuestros resultados apuntan a

que, por métodos generales, hemos logrado detectar transcritos de RNAm de AR en niveles de CTCs de hasta 6 CTCs/mL de sangre mediante una técnica de PCR de punto final y posterior observación en gel de electroforesis o bien de hasta 2 CTCs/mL de sangre desarrollando una PCR semi-anidada y la posterior observación de en gel de agarosa. Sumado a esto, nos fue posible detectar la mutación puntual que contiene la línea celular LNCaP, T878A, la cual confiere resistencia terapéutica contra agentes ADT (141).

Posteriormente logramos secuenciar por electroforesis capilar y caracterizar esta mutación y con ello se abre un abanico de posibilidades moleculares para el análisis de las CTCs. En este sentido, cuando son desarrolladas y caracterizadas nuevas tecnologías para el aislamiento y conteo de CTCs de los diferentes tipos de cáncer, el tener la posibilidad de realizar estos experimentos de caracterización molecular permite maximizar las ventajas de separación del equipo.

Estas caracterizaciones suelen ser importantes para tres aspectos fundamentales de la atención clínica de los pacientes: a) pronóstico, b) personalización de tratamientos, y c) detección de eventos de resistencia terapéutica. En este sentido, Stott y colaboradores mostraron con su dispositivo, CTC-Chip, la detección de la fusión génica *TMPRSS2-ERG* en un grupo de pacientes con cáncer de próstata vía secuenciación por electroforesis capilar (120); otros estudios han intentado realizar la cuantificación de CTCs mediante el estudio de actividad de la telomerasa por qPCR (112); más recientemente se han realizado el desarrollo de ensayos multiplex a través de plataformas de PCR digital en donde se involucran blancos génicos como *PSA*, *PSMA* o *HOXB13*(142).

Estás aplicaciones de caracterización molecular de CTCs ya han empezado a probarse en ensayos clínicos; se ha demostrado que sujetos con CaP metastásico cuyo tumor expresa la variante 7 del AR (AR-V7) presentan una resistencia terapéutica frente al tratamiento con enzalutamida y abiraterona y además es un predictor para conocer el éxito de utilizar alternativas terapéuticas con taxanos (143)

Nuestros resultados apuntan a que nuestra metodología es una de las más eficientes desde el punto de vista más importantes para la factibilidad de la aplicación clínica: 1) Alta pureza y eficiencia de captura, 2) Escalabilidad industrial para lograr la transferencia tecnológica.

### **6.2 Objetivo 3.**

Como hemos visto, el presente proyecto involucra dos vertientes acerca del conocimiento del cáncer a nivel México y América Latina. Por un lado, se realizó la detección de dos Variantes que hasta la fecha no se habían realizado en nuestra población mexicana y que por sus efectos biológicos, es necesario conocer su distribución en una población de nuestro país; además, es uno de los pocos estudios llevados a cabo en una población latina fuera de los Estados Unidos de América.

Estudios llevados a cabo en población Mexicana han reportado diferentes Variantes en la secuencia del gen *SDR5A2*, las cuales se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como hipospadias y pseudohermafroditismo (144-147). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no hay algún reporte previo en

donde se busque la presencia de las variantes A49T y V89L en este grupo étnico; como revisamos previamente, ambas variantes se han relacionado al desarrollo y protección asociada al CaP, respectivamente.

El efecto de ambas variantes analizadas es diferente de acuerdo al grupo étnico de estudio. Por ejemplo, sujetos cuyo genotipo homocigoto es Val/Val de V89L, podrían tener un efecto protector si su origen es el continente asiático, pero en otras poblaciones este mismo genotipo podría ocasionar un incremento en el riesgo de desarrollo de cáncer. Entonces, pensamos en el cáncer como una enfermedad compleja en la cual diferentes factores de riesgo juegan un papel sinérgico para su desarrollo, siendo el fondo genético uno de ellos.

El análisis de regresión logística es un tema esencial utilizado en distintas aplicaciones clínicas, dentro de las cuales podemos encontrar los modelos clínicos de predicción (148), el tamizaje de pacientes (149), y para el desarrollo y validación de nuevos modelos de diagnóstico (150). La importancia clínica de la genotipificación de las variantes analizadas en este estudio radica en la predicción del comportamiento metabólico de la vía del AR. En nuestro caso, la regresión logística podría ser utilizada en modelos de predicción para la predicción del efecto de inhibidores de la enzima esteroideos 5 alpha-reductase 2 (151).

Para llevar a cabo esta fase de este trabajo, condujimos un muestreo por conveniencia en donde los participantes en este estudio fueron sujetos que asistieron al Servicio de Urología de nuestro Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”; los sujetos de estudio fueron hombres con CaP (casos) y

hombres con otras patologías benignas de la próstata o bien sujetos acompañantes de pacientes (controles). El conocimiento generado por la Asociación Americana de Cáncer, revela que el CaP suele ser diagnosticado rumbo a la quinta década de la vida; por esta razón, la diferencia estadística entre los casos y los controles en relación a su edad fue la esperada. El análisis de variables clínicas específicas mostró resultados con significancia estadística en el contexto de los niveles de PSA y algunos factores de riesgo como el consumo de tabaco y la exposición a la biomasa. En nuestro estudio, encontramos que la mediana de PSA de los casos (20.4 ng/mL), fue significativamente más alta ( $<0.001$ ) que los controles que presentaron HPB (8.5 ng/mL), tal y como se ha visto en estudios previos (152, 153). Un estudio de tamizaje en población abierta realizado por parte de nuestro grupo de trabajo, reportó que en población muestreada de manera aleatoria y proveniente del Noreste de México, se tamizaron sujetos alrededor de los 40 años utilizando la medición de los niveles de PSA. Ellos encontraron que 125/973 (12.8%) de los participantes tuvieron valores de PSA mayores a 4 ng/mL y 55 de ellos (44%) resultaron diagnosticados con CaP (2).

Una limitante de nuestro trabajo fue la ausencia de mediciones de PSA en los sujetos sanos. Esta limitante es debida a que todos los sujetos sanos fueron reclutados por conveniencia en el Servicio de Urología, en donde aquellos los sujetos de estudio fueron categorizados como hombres con CaP y hombres sin CaP, siendo estos últimos sujetos con HPB (n=40) y sujetos sin enfermedades

prostáticas (n=60). Los estudios de asociación de las Variantes fueron realizados empleando la comparación entre los hombres con cáncer *versus* sujetos sin CaP.

No encontramos relación entre la DMT2 y el desarrollo de CaP. Solamente clasificamos a nuestros sujetos de estudio como diabéticos o no, sin considerarlos niveles de glucosa o medicamentos que pudieran estar consumiendo para su control. Un meta-análisis reciente hecho de 17 estudios que incluyó 274,677 pacientes , sus resultados sugieren que la diabetes podría inducir un peor pronóstico en los pacientes con CaP, pero no estuvo relacionado con el desarrollo de cáncer (154). Otro estudio independiente reportó un incremento en el riesgo de muerte por CaP, pero la diabetes no estuvo ligada con la incidencia de (155). La asociación con un peor pronóstico pero no con la incidencia de CaP podría ser explicada por las comorbilidades que subyacen al padecimiento de la DMT2 tales como aterosclerosis y falla renal; estos pacientes podrían tener peores respuesta a los tratamientos antitumorales. Dos meta-análisis reportaron un bajo riesgo relativo para el desarrollo de CaP en pacientes con DMT2 (156, 157). Otros estudios han presentado estudios controversiales acerca de esta enfermedad (156-160); previamente, parte de nuestro equipo de investigación encontró un riesgo incrementado entre el desarrollo de cáncer y Gleason scores > 8 en pacientes con altos niveles de glucosa en sangre (161).

Por otro lado, encontramos diferencia significativa ( $p=0.028$ ) entre la asociación del tabaquismo y el desarrollo de cáncer vs. aquellos sujetos sin cáncer (60.4% vs. 43% respectively); esto ha sido previamente demostrado que el consumo de tabaco es un factor de riesgo para el desarrollo de CaP (162-164). Se

ha reconocido que el uso de tabaco podría contribuir al desarrollo de cánceres urológicos como el de próstata, vejiga, ureteres y renal (162-165). La razón de esto podría ser que los compuestos químicos derivados de la quema del tabaco son distribuidos a otros tejidos del cuerpo a través de los vasos sanguíneos pulmonares.

Cuando el tabaco es quemado, el proceso produce una serie de compuestos carcinogénicos, principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons, PHAs por sus siglas en inglés) y nitrosaminas derivadas de nicotina, tales como N'-nitrosonornicotina (NNN) and 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). En resumen, la tumorigenesis causada es causada por la formación de aductos en el DNA. Estos aductos generan mutaciones en genes clave para el mantenimiento celular; las NNNs y NNKs podrían unirse a receptores de acetilcolina y promover eventos como la proliferación, crecimiento, supervivencia y migración celular (166). Además, los PHAs podrían unirse a receptores de aril hidrocarburo (AHRs), los cuales activan CYP1A1 y CYP1B1; los CYPs agregan un grupo epóxido a los PHAs, donde estos complejos PHAs-epóxido se unen al DNA para formar (167).

Interesantemente, encontramos diferencia significativa entre los pacientes con CaP y la exposición a la biomasa (20.8%, P-value=0.012, OR=2.89, CI=1.21-6.88). La población mexicana (principalmente la del norte del país) tiene como tradición gastronómica el consumo de alimentos cocinados a la leña, así como el desarrollo de actividades que generan partículas de tamaños menores a 10  $\mu\text{m}$ , o bien a compuestos xenobióticos, como los PHAs (168). En nuestro estudio,

entrevistamos a los pacientes para determinar con qué frecuencia ellos consumen sus alimentos empleando leña para su cocción. Diferentes estudios han demostrado como la exposición a la biomasa esta relacionada con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, principalmente de (169). El mecanismo por el cual los compuestos generados por la biomasa promueven el desarrollo tumoral no son del todo claros, pero nosotros hipotetizamos que esto podría estar relacionado a los PHAs, principalmente benzo(a)pireno. El Benzo(a)pireno tiene un papel clave en la formación de aductos del DNA (170), específicamente se involucra en mutaciones que originan cambios nucleotídicos G a T en los codones 157, 158, 248, y 273 del gen *TP53* con consecuencias catastróficas, esto de acuerdo a base de datos IARC *TP53* (R20, Julio 2019 es su última versión) (171). Los dos factores de riesgo identificados en nuestro estudio para el desarrollo de CaP (consumo de tabaco y exposición a la biomasa) fueron determinados como estadísticamente significativos después de realizar la corrección FDR en el análisis de regresión stepwise realizado, el cual fue un tema de utilidad para identificar este factor de riesgo.

Hay pocos estudios que relacionen el CaP y la exposición a la biomasa, siendo el más importante el *Cancer Prevention Studio-II (CPS-II)* de la Sociedad Americana de Cancer (172); sin embargo, los autores asociaron este factor de riesgo para cáncer de pulmón, sin haber evidencia de que se haya explorado la búsqueda de relación con el CaP.

La variante A49T esta asociada a un incremento en la actividad enzimática de la 5  $\alpha$ -reductasa, la cual convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT,

ver figura 1). La DHT, es un metabolito más potente que se enlaza al AR y resulta en una activación subsecuente de genes diana que promueven la proliferación celular, la inhibición de señales apoptóticas y una sobreexpresión de marcadores como el PSA.

Un meta-análisis publicado en 2011 por Li *et al.* encontró un riesgo significativamente alto de desarrollar estadios III/IV de CaP en sujetos homocigotos variantes (alelo Thr/Thr) de A49T empleando un modelo recesivo de análisis (P-value=0.0001, OR=2.13, CI=1.44-3.15) (54). En nuestro estudio, no encontramos asociación entre estas variantes del gen *SRD5A2* y el desarrollo del CaP. Nuestros resultados mostraron que el 3% de los sujetos fueron portadores de la variante A49T (alelo Thr/Thr) no estuvo asociado con el desarrollo de cáncer ( $p=0.327$ ). Una limitación de nuestro estudio fue que los resultados de esta variante estuvieron fuera del equilibrio de HW, posiblemente debido a la baja frecuencia de este alelo y a la falta de individuos heterocigotos en la población muestreada (173, 174). Consideramos incrementar el número de muestras analizadas con el objetivo de verificar si este resultado se mantiene para nuestra población.

Otro grupos étnicos de origen Ecuatoriano, Afro Americanos y Latinos, tuvieron una asociación con el desarrollo de CaP y la variante V89L (alelo Thr/Thr) (51, 175, 176). A diferencia de ellos, no existe una asociación entre este alelo y el CaP en poblaciones hispanas y brasileñas (177, 178). La tabla 13 muestra estos estudios de genotipificación y sus asociaciones al desarrollo de CaP.

A pesar de que se esperó que los pacientes portadores de la variante A49T tuvieran niveles elevados de PSA, los pacientes de nuestro estudio con este genotipo (alelo Thr/Thr) tuvieron valores de PSA de 5.23, 8.00, and 19.98 ng/mL, posiblemente esto es debido al estadio del tumor al momento del diagnóstico ya que fueron sujetos con cáncer no metastásico. Un número significativamente más alto de pacientes podría requerirse para verificar si esta correlación entre estas dos variables y el desarrollo de CaP en población mestiza proveniente de México.

En relación la variante V89L, el genotipo homocigoto LeuLeu ocasiona un decremento del 30% en la actividad catalítica de la enzima 5 alpha-reductasa 2, donde el genotipo *wild-type* "ValVal" se ha asociado al desarrollo de CaP y estadios más altos en la categorización Gleason.

In 1992, Ross et al. midieron de manera indirecta la actividad de la enzima esteroidea 5 alpha-reductase2 mediante la cuantificación de metabolitos derivados de la testosterona en metabolitos Afro Americanos y Asiáticos, encontrando diferencias en sus niveles atribuibles a la actividad enzimática; sin embargo, ellos no tomaron en cuenta los genotipos del gen *SRD5A2* en los sujetos analizados (43). Esto es debido al alelo Leu/Leu, de hecho, en el estudio de la población asiática se mostró que el resultado de este genotipo tiene un efecto protector contra desarrollo de CaP (44).

En nuestro estudio, pacientes con este alelo podrían haber desarrollado CaP debido a otras vías metabólicas independientes al AR, como las de reparación de daño al DNA (179), *PTEN* (69), o *TP53* (68). Por otro lado, el alelo

Leu/Leu fue asociado con el desarrollo de cáncer en estudios de genotipificación de poblaciones compuestas de Americanos con ascendencia europea (180) e Hispanos (181). Interesantemente, este alelo estuvo relacionado con Gleason Scores  $\geq 8$  en población francesa (182, 183).

Encontramos una reducida tendencia estadística con la progresión a CaP metastásico cuando analizamos portadores de los alelos Leu/Leu+Val/Leu vs. Val/Val (P-value= 0.048, OR =0.390, CI=0.142-1.073). A nuestro conocimiento, no hay reportes que atribuyan directamente esta relación, pero hipotetizamos que podría estar implicado la actividad de genes diferencialmente expresados en la metastasis de este tumor, tales como *EGR2*, *EGR3*, *MTA1*, *MYBL2* (184), *SYNPO2*, *EGR3*, *RDX*, *FOXM1*(185), o *KLF6*, *MMP9*, *WNT5A* (186). Adicionalmente, cuando un CaP vírgen a tratamiento hormonal, es tratado con ADT, su evolución al estadio metastásico podría ser posible debido a otros factores transcripcionales, como *GATA2* o *FOXA1* (187), la mutación de fusión *TMPRSS2-ERG* (70, 72), o variantes del AR (AR-V7) (188, 189).

*SRD5A2*, *CYP17A1*, y *CYP19A1* están involucrados en la vías metabólicas esteroidea (GO:0008202) y biosintética (GO:0006694). En *Mus musculus*, el benzo(a)pireno ha sido relacionado a la red de interacción Proteína-Proteína de los procesos de oxidación-reducción (GO:0055114) (Permanent link: <http://bit.ly/2jlbOER>) (190). Los genes involucrados en esta red, participan en la oxidación mediada por el citocromo P450 (*Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Cyp1a2*, *Cyp21a1*, *Cyp3a11*, *Cyp3a13*, *Cyp3a16*, *Cyp3a25*, *Cyp3a41a*), y la reducción de estrógenos y andrógenos (*Srd5a2*, *Akr1d1*, *Hsd17b1*, and *Hsd3b4*).

El alelo Val/Val es más frecuente en población blanca Hispanic/non-Hispanic y Ecuatoriana y ha sido asociado con el desarrollo de CaP; en nuestra población Mexicana-mestiza, no encontramos esta asociación. Se ha visto que este alelo podría contribuir a empeorar el pronóstico clínico de los pacientes relacionados con la supervivencia global, tal y como fue descrita en estudios previos cuando se compraron las distintas variantes genéticas y la actividad del AR (191).

La tabla 14 resume estos estudios de genotipificación de V89L y sus potenciales implicaciones con el desarrollo de CaP, metastasis, Gleason Score o el efecto protector antitumoral (44, 175, 180-183, 192).

Nuestro análisis mostró una no relación entre los genotipos del rs523349 correspondientes al gen y tumores con Gleason scores  $\geq 8$ ; sin embargo, esta tendencia fue reducida entre los pacientes con metastasis y los genotipos rs523349 (Val/Val vs. Leu/Leu+Val/Leu P-value=0.048, OR=0.390, 0.142-1.073).

**Tabla 13. Efectos clínicos de la variante A49T (rs9282858) en otras poblaciones analizadas.**

<b>Población</b>	<b>Efecto</b>	<b>Genotipo (s)</b>	<b>Año</b>	<b>Autor</b>
Afro-americana	Asociada al desarrollo de cáncer	Thr/Thr	1999	Makridakis
Brasileña	No asociada al desarrollo de cáncer	Thr/Thr	2002	Ribeiro
Hispana/afroamericana	No asociada al desarrollo de cáncer	Ala/Thr	2008	Pearce
Ecuatoriana	Asociada al aumento de riesgo de cáncer	Thr/Thr vs Ala/Thr	2009	Paz y Miño
Latina	Asociada al desarrollo de cáncer	Thr/Thr	2017	Fang

**Tabla 14. Efectos clínicos de la variante V89L (rs523349) en otras poblaciones analizadas.**

<b>Población</b>	<b>Efecto</b>	<b>Genotipo (s)</b>	<b>Año</b>	<b>Autor</b>
Asiática	Protectos contra el desarrollo de CaP	Leu/Leu	1997	Makridakis
Caucásica	Asociado a metastasis	Leu/Leu	2002	Soderström
Americanos europeos	Asociado al desarrollo de cáncer	Leu/Leu vs ValLeu	2004	Loukola†
Hispana	Asociado al desarrollo de cáncer	Leu/Leu	2005	Salam
Francesa	Asociado a Gleasons Scores $\geq 8$	Leu/Leu	2007	Cussenot
Blancos no hispanos	Asociado al desarrollo de cáncer	Val/Val*	2008	Torkko
Blancoshispanos	Asociado al desarrollo de cáncer	Val/Val **		
Ecuatoriana	Asociado al desarrollo de cáncer	Val/Val	2009	Paz y Miño

†Análisis de genotipificación que mostró estar fuera del HWE. \*Resultados combinados con la genotipificación de variantes en el gen *VDR*. \*\*Resultados combinados con las variantes en el gen *CDX2*.

El pronóstico clínico de nuestra cohorte de pacientes de CaP en relación al estudio de la enzima esteroidea 5 alpha-reductasa 2 tuvo dos limitaciones: 1) nuestro estudio incluyó pacientes con enfermedad localizada y metastásica sin discriminar su tiempo de evolución, y 2) el tipo de ADT al momento del reclutamiento de pacientes.

En la práctica clínica, observamos que el tratamiento de primera línea para pacientes con enfermedad localmente avanzada de la próstata, es la bicalutamida más la administración de un fármaco agonista o antagonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés) y este esquema varía en función de la respuesta terapéutica de los pacientes al uso de otros agentes como enzalutamida, acetato de abiraterona, apalutamida o bien el uso de taxanos (193).

Finalmente, respecto a los sujetos con HPB, un meta-análisis hecho en 2017 por Zheng *et al.* encontraron un riesgo de desarrollo de esta condición benigna en individuos portadores de la variante 49T (OR=2.75, CI=1.32-5.69), sin encontrar una diferencia estadística significativa (P-value=0.373) (194). En contraste, estudios concernientes a la variante V89L y su relación con el desarrollo de HPB han documentado resultados contradictorios (195, 196). En uno de ellos, fue encontrado que el genotipo Val/Leu + Leu/Leu (P-value=0.047, OR=1.62, CI=1.00-2.61) fue relacionado al desarrollo de HPB, pero no de CaP (197).

Sin embargo, en otro estudio, ninguno de esos genotipos fue asociado con el desarrollo de HPB (194). Como perspectiva de esto, es necesario llevar a cabo

un estudio longitudinal de sujetos mexicanos a los cuales se les genotipifique para la variante V89L con el objetivo de describir las frecuencias de los diferentes genotipos y se determine si alguno de ellos tiene un rol pronóstico de CaP, HPB así como sus potenciales usos como biomarcadores en la personalización de tratamientos farmacológicos inhibidores dirigidos hacia la enzima 5 alpha-reductase (198).

**Resumiendo**, la lucha contra los diferentes tipos de cánceres que aquejan la salud del ser humano debe contemplar un manejo integral de los pacientes, en donde se tenga a la disposición clínica de pruebas con mayor especificidad y sensibilidad según sea el caso. Para el CaP, la NCCN contempla el estudio de distintos test aplicables en diferentes etapas de la enfermedad desde el diagnóstico temprano, la estratificación hasta el seguimiento a la terapia farmacológica.

La última versión de las guías clínicas para PCa, actualizadas año con año, ya no sólo contempla las pruebas clásicas para el manejo de los pacientes (PSA, DRE y biopsia), si no que ahora las complementa la utilización de biopsias líquidas en la detección temprana y el seguimiento terapéutico. En ese sentido, se han analizado la expresión de ciertos genes en orina, tales como PCA3-ERG (199) o PSA-PCA3 (200).

Por otro lado, resulta interesante que en estas guías de manejo clínico ya sea sugerida la utilización de una prueba de CTCs para la identificación de la AR-V7. La identificación de esta variante representa una ventaja en el tratamiento del

paciente metastasico ya sea como opción para tomar el tratamiento de primera línea o bien, en aquel paciente metastásico que ha progresado a una resistencia a la castración (193, 201). También, otra de las ventajas de identificar la AR-V7, es establecer pronósticos de la enfermedad metastásica, ya que se ha visto que los pacientes que son portadores de esta variante tienen una menor supervivencia global (201).

Las perspectivas de nuestros hallazgos implican la realización de estudios posteriores en donde se incluya una cohorte más grande de pacientes con los diferentes estadios clínicos de la enfermedad y una mayor cantidad de sujetos control, así como también que sean ampliadas las caracterizaciones moleculares de las CTCs lo que permitirá incrementar los potenciales blancos de diagnóstico y terapia de los pacientes.

Sumado a ello, los estudios moleculares de genotipificación en nuestra población permitirá conocer otras características propias de nuestro grupo étnico y con ello mejorar el entendimiento de ciertas características metabólicas de la enfermedad que puedan ser empleadas con fines terapéuticos (202).

## Capítulo 7

### Conclusiones

El presente estudio permitió la estandarización de un nuevo dispositivo de separación por filtración, basado en propiedades intrínsecas de las CTCs como el tamaño y la deformabilidad. El proceso permitió establecer los parámetros óptimos de separación celular, empleando la plataforma de alto rendimiento Cytocatch™ a través de una membrana porosa en un proceso automatizado en donde fue posible la identificación celular *in situ* empleando la detección de células nucleadas PSMA+/CK+/CD45-, PSMA-/CK+/CD45- y/o PSMA+/CK-/CD45. La cuantificación fue posible gracias a la inserción de un sistema de imagen de alta resolución que emplea una rutina de autoenfoco y la identificación de los eventos nucleados a través de un algoritmo educado por inteligencia artificial. Además, demostramos la capacidad que tiene nuestra tecnología para el desarrollo de pruebas de caracterización molecular de CTCs de CaP.

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio en su tipo en México y América Latina y nuestros resultados apuntan a que nuestra tecnología cuenta con el potencial de ser transferida a la práctica clínica diaria para el empleo de biopsias líquidas de pacientes, en principio, de cáncer de próstata y posteriormente otros cánceres epiteliales.

Por otro lado, logramos aportar al conocimiento de las variantes genéticas de población mexicana de dos variantes en la enzima 5alpha reductasa encontrando que en la población muestreada no existe una asociación con el desarrollo o efecto protector contra el CaP; sin embargo, el análisis de nuestros

sujetos de estudio nos reveló que existe un riesgo incrementado al desarrollo de cáncer en sujetos fumadores y aquellos que estuvieron expuestos a fuentes de biomasa, además de la tendencia para la variante V89L y el desarrollo de metastasis.

Para nuestro grupo étnico, es importante la elucidación de las frecuencias alélicas y genotípicas de diversas variantes genéticas implicadas en proteínas importantes para el metabolismo de las células tumorales, ya que nos permite tener un mejor entendimiento de las características moleculares de una enfermedad y con ello la posibilidad de establecer escenarios de pronóstico.

## CAPÍTULO 8

### Referencias

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018. Epub 2018/09/13.
2. Gomez-Guerra LS, Martinez-Fierro ML, Alcantara-Aragon V, Ortiz-Lopez R, Martinez-Villarreal RT, Morales-Rodriguez IB, et al. Population based prostate cancer screening in north Mexico reveals a high prevalence of aggressive tumors in detected cases. *BMC cancer*. 2009;9(91):1471-2407.
3. Cancer Research UK. Types and grades of prostate cancer. 2016.
4. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(3):125-8.
5. Murphy GP, Whitmore WF, Jr. A report of the workshops on the current status of the histologic grading of prostate cancer. *Cancer*. 1979;44(4):1490-4.
6. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(3):292-306. Epub 2004/02/21.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta, Ga: American Cancer Society. 2016.
8. Partin MR, Lillie SE, White KM, Wilt TJ, Chrouser KL, Taylor BC, et al. Similar perspectives on prostate cancer screening value and new guidelines across patient demographic and PSA level subgroups: A qualitative study. *Health expectations : an international journal of public participation in health care and health policy*. 2016. Epub 2016/11/04.
9. Nwaneri AC, McBeth L, Hinds TD. Prostate Cancer in African American Men: The Effect of Androgens and microRNAs on Epidermal Growth Factor Signaling. *Hormones and Cancer*. 2016;7(5):296-304.
10. Anderson B, Marshall-Lucette S. Prostate cancer among Jamaican men: exploring the evidence for higher risk. *Br J Nurs*. 2016;25(19):1046-51.
11. Oliveira JS, Ferreira RS, Santos LM, Marin LJ, Correa RX, Luizon MR, et al. Self-declared ethnicity and genomic ancestry in prostate cancer patients from Brazil. *Genet Mol Res*. 2016;15(4). Epub 2016/11/05.
12. Ferris-i-Tortajada J, Garcia-i-Castell J, Berbel-Tornero O, Ortega-Garcia JA. [Constitutional risk factors in prostate cancer]. *Actas Urol Esp*. 2011;35(5):282-8.
13. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8611-6.
14. Tan RBW, Silberstein JL, Hellstrom WJG. Testosterone and the Prostate. *Sexual Medicine Reviews*. 2014;2(3-4):112-20.
15. Cui Y, Zong H, Yan H, Zhang Y. The effect of testosterone replacement therapy on prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2014;17(2):132-43.
16. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(5):443-53.

17. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *Jama*. 2016;315(1):68.
18. Giri VN, Gross L, Gomella LG, Hyatt C. How I Do It: Genetic counseling and genetic testing for inherited prostate cancer. *Can J Urol*. 2016;23(2):8247-53.
19. Stern MC. Prostate Cancer in US Latinos: What Have We Learned and Where Should We Focus Our Attention. In: Ramirez AG, Trapido EJ, editors. *Advancing the Science of Cancer in Latinos*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 57-67.
20. Sauve JF, Stapleton EM, O'Shaughnessy PT, Locke SJ, Josse PR, Altmaier RW, et al. Diesel Exhaust Exposure during Farming Activities: Statistical Modeling of Continuous Black Carbon Concentrations. *Annals of work exposures and health*. 2020. Epub 2020/03/29.
21. Islami F, Moreira DM, Boffetta P, Freedland SJ. A systematic review and meta-analysis of tobacco use and prostate cancer mortality and incidence in prospective cohort studies. *European urology*. 2014;66(6):1054-64. Epub 2014/09/23.
22. Mohler JL, Armstrong AJ, Bahnson RR, D'Amico AV, Davis BJ, Eastham JA, et al. Prostate Cancer, Version 1.2016. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2016;14(1):19-30.
23. Katz R. Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. *NeuroRx*. 2004;1(2):189-95.
24. Stein BS, Vangore S, Petersen RO, Kendall AR. Immunoperoxidase localization of prostate-specific antigen. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(6):553-7.
25. Tomao L, Sbardella D, Gioia M, Di Masi A, Marini S, Ascenzi P, et al. Characterization of the prostate-specific antigen (PSA) catalytic mechanism: a pre-steady-state and steady-state study. *PloS one*. 2014;9(7):e102470. Epub 2014/07/30.
26. Heidenreich A, Abrahamsson PA, Artibani W, Catto J, Montorsi F, Van Poppel H, et al. Early detection of prostate cancer: European Association of Urology recommendation. *European urology*. 2013;64(3):347-54.
27. Loeb S, Roehl KA, Antenor JAV, Catalona WJ, Suarez BK, Nadler RB. Baseline prostate-specific antigen compared with median prostate-specific antigen for age group as predictor of prostate cancer risk in men younger than 60 years old. *Urology*. 2006;67(2):316-20.
28. Ablin R, Haythorn M. Screening for prostate cancer: Controversy? What controversy?: *Curr Oncol*. 2009 May;16(3):1-2.
29. Brawley OW, Thompson IM, Jr., Gronberg H. Evolving Recommendations on Prostate Cancer Screening. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35(7).
30. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *European urology*. 2012;61(6):1079-92.
31. Kaufman JJ, Rosenthal M, Goodwin WE. Needle biopsy in diagnosis of prostatic cancer. *Calif Med*. 1954;81(5):308-13.
32. Halpern JA, Shoag JE, Mittal S, Oromendia C, Ballman KV, Hershman DL, et al. Prognostic Significance of Digital Rectal Examination and Prostate Specific Antigen in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Arm. *J Urol*. 2016. Epub 2016/10/22.
33. Issa MM, Zasada W, Ward K, Hall JA, Petros JA, Ritenour CW, et al. The value of digital rectal examination as a predictor of prostate cancer diagnosis among United States Veterans referred for prostate biopsy. *Cancer detection and prevention*. 2006;30(3):269-75. Epub 2006/07/18.
34. Barati M, Amirzargar MA, Bashirian S, Kafami V, Mousali AA, Moeini B. Psychological Predictors of Prostate Cancer Screening Behaviors Among Men Over 50 Years of Age in Hamadan: Perceived Threat and Efficacy. *Iran J Cancer Prev*. 2016;9(4).

35. Lorente D, Mateo J, Perez-Lopez R, de Bono JS, Attard G. Sequencing of agents in castration-resistant prostate cancer. *The Lancet Oncology*.16(6):e279-e92.
36. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International journal of clinical practice*. 2011;65(11):1180-92. Epub 2011/10/15.
37. Hirst CJ, Cabrera C, Kirby M. Epidemiology of castration resistant prostate cancer: a longitudinal analysis using a UK primary care database. *Cancer epidemiology*. 2012;36(6):e349-53. Epub 2012/08/23.
38. Kokal M, Mirzakhani K, Pungsrinont T, Baniahmad A. Mechanisms of Androgen Receptor Agonist- and Antagonist-Mediated Cellular Senescence in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7). Epub 2020/07/12.
39. Kregel S, Bagamasbad P, He S, LaPensee E, Raji Y, Brogley M, et al. Differential modulation of the androgen receptor for prostate cancer therapy depends on the DNA response element. *Nucleic acids research*. 2020;48(9):4741-55. Epub 2020/03/22.
40. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):34-45. Epub 2002/03/20.
41. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational andrology and urology*. 2015;4(3):365-80. Epub 2016/01/28.
42. Batista RL, Mendonca BB. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet*. 2020;13:83-96.
43. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, et al. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet*. 1992;339(8798):887-9.
44. Makridakis N, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, et al. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. *Cancer Res*. 1997;57(6):1020-2.
45. Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JP. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2003;12(7):618-24.
46. Reichardt JK, Makridakis N, Henderson BE, Yu MC, Pike MC, Ross RK. Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res*. 1995;55(18):3973-5.
47. Davis DL, Russell DW. Unusual length polymorphism in human steroid 5 alpha-reductase type 2 gene (SRD5A2). *Hum Mol Genet*. 1993;2(6):820.
48. Ruijter E, van de Kaa C, Miller G, Ruiters D, Debruyne F, Schalken J. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine reviews*. 1999;20(1):22-45.
49. Makridakis NM, di Salle E, Reichardt JK. Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics*. 2000;10(5):407-13.
50. Hsing AW, Chen C, Chokkalingam AP, Gao YT, Dightman DA, Nguyen HT, et al. Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2001;10(10):1077-82.
51. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, et al. Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *The Lancet*. 1999;354(9183):975-8.

52. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, et al. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate*. 2007;67(15):1654-63.
53. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:25-61.
54. Li X, Huang Y, Fu X, Chen C, Zhang D, Yan L, et al. Meta-analysis of three polymorphisms in the steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 gene (SRD5A2) and risk of prostate cancer. *Mutagenesis*. 2011;26(3):371-83. Epub 2010/12/24.
55. Bentley AR, Callier S, Rotimi CN. Diversity and inclusion in genomic research: why the uneven progress? *J Community Genet*. 2017;8(4):255-66.
56. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014;344(6189):1280-5.
57. Villarreal-Martínez A, Gallardo-Blanco H, Cerda-Flores R, Torres-Muñoz I, Gómez-Flores M, Salas-Alanís J, et al. Candidate gene polymorphisms and risk of psoriasis: A pilot study. *Exp Ther Med*. 2016;11(4):1217-22.
58. Patiño-García B, Arroyo C, Rangel-Villalobos H, Soto-Vega E, Velarde-Félix JS, Gabilondo F, et al. Association between polymorphisms of the androgen and vitamin D receptor genes with prostate cancer risk in a Mexican population. *Rev Invest Clin*. 2007;59(1):25-31.
59. Martínez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Rojas-Martínez A, Ortiz-Lopez R, Castruita-de la Rosa C, Ortiz-Castro Y, et al. Positive association between vascular endothelial growth factor (VEGF) -2578 C/A variant and prostate cancer. *Cancer Biomark*. 2013;13(4):235-41. Epub 2013/11/19.
60. Canto P, Benitez Granados J, Martínez Ramírez MA, Reyes E, Feria-Bernal G, García-García E, et al. Genetic variants in ATP6 and ND3 mitochondrial genes are not associated with aggressive prostate cancer in Mexican-Mestizo men with overweight or obesity. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male*. 2016;19(3):187-91. Epub 2016/05/18.
61. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nussbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
62. An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome: *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi:10.1038/nature11247.
63. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
64. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2013;25(10).
65. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
66. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never Smokers: *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1121-34. doi:10.1016/j.cell.2012.08.024.
67. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Gronberg H, et al. The mutational landscape of prostate cancer. *European urology*. 2013;64(4):567-76. Epub 2013/06/14.
68. Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, Sachs MD, Lenk SV, Rudolph BD, et al. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1579-86.
69. Ruscetti MA, Wu H. PTEN in Prostate Cancer. 2013:87-137.
70. Squire JA. TMRSS2-ERG and PTEN loss in prostate cancer: *Nat Genet*. 2009 May;41(5):509-10. doi: 10.1038/ng0509-509.
71. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(4):256-69. Epub 2007/03/27.

72. Kiflemariam S, Mignardi M, Ali MA, Bergh A, Nilsson M, Sjoblom T. In situ sequencing identifies TMPRSS2-ERG fusion transcripts, somatic point mutations and gene expression levels in prostate cancers. *The Journal of pathology*. 2014;234(2):253-61. Epub 2014/06/17.
73. Boysen G, Barbieri CE, Prandi D, Blattner M, Chae S-S, Dahija A, et al. SPOP mutation leads to genomic instability in prostate cancer. *eLife*. 2015;4:e09207.
74. Liu Y, Chen XG, Liang CZ. [Expressions of E-cadherin and N-cadherin in prostate cancer and their implications]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2014;20(9):781-6.
75. Ikonen T, Matikainen M, Mononen N, Hyytinen E-R, Helin HJ, Tammola S, et al. Association of **E-Cadherin** Germ-Line Alterations with Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(11):3465-71.
76. Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*. 2000;19(55):6533-48.
77. Selvaraj N, Budka JA, Ferris MW, Jerde TJ, Hollenhorst PC. Prostate cancer ETS rearrangements switch a cell migration gene expression program from RAS/ERK to PI3K/AKT regulation. *Molecular Cancer*. 2014;13(1):61.
78. Schmidt-Hegemann NS, Stief C, Kim TH, Eze C, Kirste S, Strouthos I, et al. Outcome after PSMA PET/CT based salvage radiotherapy in patients with biochemical recurrence after radical prostatectomy: a bi-institutional retrospective analysis. *J Nucl Med*. 2018;12(118):212563.
79. Cai C, He HH, Chen S, Coleman I, Wang H, Fang Z, et al. Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer cell*. 2011;20(4):457-71. Epub 2011/10/22.
80. Mills IG. Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(3):187-98. Epub 2014/02/25.
81. Delgado Balderas JR. Rastreo de mutaciones para la detección del cáncer de ovario [Masters]: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.
82. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014;6(224):3007094.
83. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(6):579-86. Epub 2014/01/23.
84. Pantel K, Diaz LA, Jr., Polyak K. Tracking tumor resistance using 'liquid biopsies'. *Nat Med*. 2013;19(6):676-7.
85. Ashworth TR. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *The Medical Journal of Australia*. 1869;14:146-7.
86. Nieva JJ, Kuhn P. Fluid biopsy for solid tumors: a patient's companion for lifelong characterization of their disease. *Future Oncol*. 2012;8(8):989-98. Epub 2012/08/17.
87. van der Toom EE, Axelrod HD, de la Rosette JJ, de Reijke TM, Pienta KJ, Valkenburg KC. Prostate-specific markers to identify rare prostate cancer cells in liquid biopsies. *Nat Rev Urol*. 2019;16(1):7-22. Epub 2018/11/28.
88. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*. 2014;4(6):650-61. Epub 2014/05/08.
89. LLC V. "CellSearch circulating tumor cell kit premarket notification-expanded indications for use—metastatic prostate cancer". 2008.
90. Adams DL, Stefansson S, Haudenschield C, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their

correlation to the CellSearch((R)) CTC test. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015;87(2):137-44. Epub 2014/12/18.

91. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of oncology*. 2010;2010:617421. Epub 2009/12/18.

92. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular oncology*. 2016;10(3):395-407. Epub 2016/01/23.

93. Coumans F, Terstappen L. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by the CellSearch Approach. *Methods Mol Biol*. 2015;1347:263-78. Epub 2015/09/17.

94. Arya SK, Lim B, Rahman AR. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells. *Lab on a chip*. 2013;13(11):1995-2027. Epub 2013/04/30.

95. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Molecular oncology*. 2016;10(3):374-94. Epub 2016/02/22.

96. Beije N, Jager A, Sleijfer S. Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev*. 2015;41(2):144-50.

97. Shaw Bagnall J, Byun S, Begum S, Miyamoto DT, Hecht VC, Maheswaran S, et al. Deformability of Tumor Cells versus Blood Cells. *Scientific reports*. 2015;5:18542. Epub 2015/12/19.

98. Aguilar-Avelar C, Soto-Garcia B, Araiz-Hernandez D, Yee-de Leon JF, Esparza M, Chacon F, et al. High-Throughput Automated Microscopy of Circulating Tumor Cells. *Scientific reports*. 2019;9(1):13766. Epub 2019/09/26.

99. Yee-de Leon JF, Soto-Garcia B, Araiz-Hernandez D, Delgado-Balderas JR, Esparza M, Aguilar-Avelar C, et al. Characterization of a novel automated microfiltration device for the efficient isolation and analysis of circulating tumor cells from clinical blood samples. *Scientific reports*. 2020;10(1):7543. Epub 2020/05/07.

100. Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ, McNeal JE, Kozlowski JM, Lee C. Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J Urol*. 1990;143(1):167-71.

101. Delgado Balderas JR. Rastreo de mutaciones para la detección del cáncer de ovario: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.

102. Sanchez-Dominguez CN, Reyes-Lopez MA, Bustamante A, Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres Mdel C, Gallardo-Blanco HL, et al. The tumor necrosis factor alpha (-308 A/G) polymorphism is associated with cystic fibrosis in Mexican patients. *PloS one*. 2014;9(3).

103. Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldaña HA. C3435T polymorphism in the MDR1 gene and breast cancer risk in northeastern Mexico. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(2):904-9.

104. Srigley JR, Delahunt B, Samaratunga H, Billis A, Cheng L, Clouston D, et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. *Pathology*. 2019;51(5):463-73. Epub 2019/07/08.

105. Apel P, Blonskaya I, Dmitriev S, Orelovitch O, Sartowska B. Structure of polycarbonate track-etch membranes: Origin of the "paradoxical" pore shape. *Journal of Membrane Science*. 2006;282(1-2):393-400.

106. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(1):57-63.

107. Chen F, Wang S, Fang Y, Zheng L, Zhi X, Cheng B, et al. Feasibility of a novel one-stop ISET device to capture CTCs and its clinical application. *Oncotarget*. 2017;8(2):3029-41.

108. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Janne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 2011;31(2):427-41.
109. Tai Y.C. YX. MICROMACHINED MEMBRANE PARTICLE FILTER USING PARYLENE REINFORCEMENT US6598750 Patent. 2000.
110. Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of chromatography A.* 2007;1162(2):154-61. Epub 2007/06/15.
111. Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M, Groshen S, Scher HI, et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2010;16(20):5011-8. Epub 2010/09/30.
112. Xu T, Lu B, Tai YC, Goldkorn A. A cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on a microfilter. *Cancer Res.* 2010;70(16):6420-6. Epub 2010/07/29.
113. Fleischer RL, Price PB, Symes EM. Novel Filter for Biological Materials. *Science.* 1964;143(3603):249-50.
114. Warkiani ME, Lou CP, Liu HB, Gong HQ. A high-flux isopore micro-fabricated membrane for effective concentration and recovering of waterborne pathogens. *Biomedical microdevices.* 2012;14(4):669-77. Epub 2012/03/24.
115. Zhu B, Duke M, Dumee LF, Merenda A, des Ligneris E, Kong L, et al. Short Review on Porous Metal Membranes-Fabrication, Commercial Products, and Applications. *Membranes.* 2018;8(3). Epub 2018/09/21.
116. Hosokawa M, Hayata T, Fukuda Y, Arakaki A, Yoshino T, Tanaka T, et al. Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells. *Anal Chem.* 2010;82(15):6629-35.
117. Adams DL, Zhu P, Makarova OV, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC Adv.* 2014;9:4334-42.
118. Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsvangwa K, Berney D, et al. Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. *PLoS one.* 2015;10(9):e0138032. Epub 2015/09/24.
119. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(20):6897-904. Epub 2004/10/27.
120. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells from Patients with Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Science translational medicine.* 2010;2(25):25ra3-ra3.
121. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(43):18392-7.
122. Green BJ, Nguyen V, Atenafu E, Weeber P, Duong BTV, Thiagalingam P, et al. Phenotypic Profiling of Circulating Tumor Cells in Metastatic Prostate Cancer Patients Using Nanoparticle-Mediated Ranking. *Analytical Chemistry.* 2019;91(15):9348-55.
123. Chen S, Tauber G, Langsenlehner T, Schmölder LM, Pötscher M, Riethdorf S, et al. In Vivo Detection of Circulating Tumor Cells in High-Risk Non-Metastatic Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Cancers.* 2019;11(7).

124. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With <sup>125</sup>I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1970;45(4):773-82.
125. Hanna N. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1982;1(1):45-64.
126. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer cell*. 2017;32(3):282-93. Epub 2017/09/13.
127. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(8):563-72. Epub 2002/08/03.
128. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(19):6302-9. Epub 2008/10/03.
129. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019;20(2):69-84. Epub 2018/11/22.
130. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
131. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Translational oncology*. 2013;6(5):528-38. Epub 2013/10/24.
132. Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*. 1998;82(11):2256-61.
133. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Möller P, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol*. 2007;38(5):696-701.
134. Kratochwil C, Giesel FL, Stefanova M, Benesova M, Bronzel M, Afshar-Oromieh A, et al. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with <sup>177</sup>Lu-Labeled PSMA-617. *J Nucl Med*. 2016;57(8):1170-6. Epub 2016/03/18.
135. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, Chanel-Vos C, et al. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device. *PLoS one*. 2012;7(4):27.
136. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, Garcia-Villa A, Deighan C, Wu Y, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2).
137. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017;97(1):4-13.
138. Leone K, Poggiana C, Zamarchi R. The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy. *Diagnostics (Basel)*. 2018;8(3). Epub 2018/09/12.
139. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(9):3514-9.
140. Adams DL, Adams DK, Alpaugh RK, Cristofanilli M, Martin SS, Chumsri S, et al. Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016;25(7):1037-42.

141. Prekovic S, van Royen ME, Voet AR, Geverts B, Houtman R, Melchers D, et al. The Effect of F877L and T878A Mutations on Androgen Receptor Response to Enzalutamide. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(7):1702-12.
142. Miyamoto DT, Lee RJ, Kalinich M, LiCausi JA, Zheng Y, Chen T, et al. An RNA-Based Digital Circulating Tumor Cell Signature Is Predictive of Drug Response and Early Dissemination in Prostate Cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(3):288-303. Epub 2018/01/06.
143. Antonarakis ES, Tagawa ST, Galletti G, Worroll D, Ballman K, Vanhuyse M, et al. Randomized, Noncomparative, Phase II Trial of Early Switch From Docetaxel to Cabazitaxel or Vice Versa, With Integrated Biomarker Analysis, in Men With Chemotherapy-Naïve, Metastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(28):3181-8.
144. Canto P, Vilchis F, Chavez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Perez-Palacios G, et al. Mutations of the 5 alpha-reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 alpha-reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol*. 1997;46(2):155-60.
145. Chavez B, Valdez E, Vilchis F. Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(9):3147-50.
146. Vilchis F, Valdez E, Ramos L, Garcia R, Gomez R, Chavez B. Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *J Hum Genet*. 2008;53(5):401-6.
147. Shih EM, Graham JM, Jr. Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias. *European journal of medical genetics*. 2014;57(8):453-63. Epub 2014/03/25.
148. Zhou ZR, Wang WW, Li Y, Jin KR, Wang XY, Wang ZW, et al. In-depth mining of clinical data: the construction of clinical prediction model with R. *Annals of translational medicine*. 2019;7(23):63.
149. Dong R, Jiang J, Zhang S, Shen Z, Chen G, Huang Y, et al. Development and Validation of Novel Diagnostic Models for Biliary Atresia in a Large Cohort of Chinese Patients. *EBioMedicine*. 2018;34:223-30. Epub 2018/08/06.
150. Sun G, Nakayama Y, Dagdanpurev S, Abe S, Nishimura H, Kirimoto T, et al. Remote sensing of multiple vital signs using a CMOS camera-equipped infrared thermography system and its clinical application in rapidly screening patients with suspected infectious diseases. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017;55:113-7. Epub 2017/01/18.
151. Shiota M, Fujimoto N, Yokomizo A, Takeuchi A, Kashiwagi E, Dejima T, et al. The prognostic impact of serum testosterone during androgen-deprivation therapy in patients with metastatic prostate cancer and the SRD5A2 polymorphism. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016;19(2):191-6. Epub 2016/02/10.
152. Kusuma Duarsa GW, Sari YA, Gde Oka AA, Santosa KB, Yudiana IW, Wisnu Tirtayasa PM, et al. Serum testosterone and prostate-specific antigen levels are major risk factors for prostatic volume increase among benign prostatic hyperplasia patients. *Asian Journal of Urology*. 2020.
153. Golchin-Rad K, Mogheiseh A, Nazifi S, Ahrari Khafi MS, Derakhshandeh N, Abbaszadeh-Hasiri M. Changes in the Serum Prostatic Biomarkers During the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia with a 5alpha-reductase Inhibitor: Finasteride. *Topics in companion animal medicine*. 2020;38:100405. Epub 2020/03/03.
154. Lee J, Giovannucci E, Jeon JY. Diabetes and mortality in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Springerplus*. 2016;5(1):1548.
155. Marrone MT, Selvin E, Barber JR, Platz EA, Joshi CE. Hyperglycemia, Classified with Multiple Biomarkers Simultaneously in Men without Diabetes, and Risk of Fatal Prostate Cancer. *Cancer Prev Res*. 2019;12(2):103-12.

156. Bansal D, Bhansali A, Kapil G, Undela K, Tiwari P. Type 2 diabetes and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16(2):151-8, S1. Epub 2012/10/04.
157. Lin E, Garmo H, Van Hemelrijck M, Adolfsson J, Stattin P, Zethelius B, et al. Association of type 2 diabetes mellitus and antidiabetic medication with risk of prostate cancer: a population-based case-control study. *BMC cancer.* 2020;20(1):020-07036.
158. Haggstrom C, Van Hemelrijck M, Zethelius B, Robinson D, Grundmark B, Holmberg L, et al. Prospective study of Type 2 diabetes mellitus, anti-diabetic drugs and risk of prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2017;140(3):611-7. Epub 2016/11/04.
159. Azoulay L, Dell'Aniello S, Gagnon B, Pollak M, Suissa S. Metformin and the incidence of prostate cancer in patients with type 2 diabetes. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2011;20(2):337-44. Epub 2010/12/15.
160. Tseng CH. Metformin significantly reduces incident prostate cancer risk in Taiwanese men with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cancer.* 2014;50(16):2831-7. Epub 2014/09/10.
161. Garza-Guajardo R, Delgado-Enciso I, Melo-De-La-Garza A, Rodriguez-Sanchez I, Laura G-L, Martinez-Fierro ML, et al. High fasting glucose, but not metabolic syndrome, is associated with elevated histologic aggressiveness in Mexican prostate cancer patients. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2016;9:11951-7.
162. Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL, Stanford JL. Cigarette Smoking and Risk of Prostate Cancer in Middle-Aged Men. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2003;12(7):604-9.
163. Zu K, Giovannucci E. Smoking and aggressive prostate cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer causes & control : CCC.* 2009;20(10):1799-810. Epub 2009/06/30.
164. Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American journal of public health.* 2010;100(4):693-701. Epub 2009/07/18.
165. Services. USDoHaH. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2010.
166. Xue J, Yang S, Seng S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers (Basel).* 2014;6(2):1138-56. Epub 2014/05/17.
167. Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and molecular mutagenesis.* 2005;45(2-3):106-14. Epub 2005/02/03.
168. Zelikoff JT, Chen LC, Cohen MD, Schlesinger RB. The toxicology of inhaled woodsmoke. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews.* 2002;5(3):269-82. Epub 2002/08/07.
169. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Household Use of Solid Fuels and High-temperature Frying. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2010. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 95.) 2, Studies of Cancer in Humans. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385519/>.

170. Li N, Luo HD, Jia YZ, Zhou N, Li YQ. Rapid determination of benzo(a)pyrene in processed meat and fish samples by second-derivative constant-energy synchronous fluorescence spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011;28(2):235-42.
171. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat.* 2016;37(9):865-76.
172. Stellman SD, Demers PA, Colin D, Boffetta P. Cancer mortality and wood dust exposure among participants in the American Cancer Society Cancer Prevention Study-II (CPS-II). *Am J Ind Med.* 1998;34(3):229-37.
173. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Frontiers in genetics.* 2017;8:167. Epub 2017/11/23.
174. McQuillan R, Leutenegger AL, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, et al. Runs of homozygosity in European populations. *American journal of human genetics.* 2008;83(3):359-72. Epub 2008/09/02.
175. Paz-y-Mino C, Witte T, Robles P, Llumipanta W, Diaz M, Arevalo M. Association among polymorphisms in the steroid 5alpha-reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumors in an Ecuadorian population. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2009;189(2):71-6. Epub 2009/02/14.
176. Fang C, Guo ZQ, Chen XY, Liu TZ, Zeng XT, Wang XH. Relationship between SRD5A2 rs9282858 polymorphism and the susceptibility of prostate cancer: A meta-analysis based on 20 publications. *Medicine.* 2017;96(19):e6791. Epub 2017/05/11.
177. Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(2):205-13.
178. Pearce CL, Van Den Berg DJ, Makridakis N, Reichardt JK, Ross RK, Pike MC, et al. No association between the SRD5A2 gene A49T missense variant and prostate cancer risk: lessons learned. *Hum Mol Genet.* 2008;17(16):2456-61. Epub 2008/05/13.
179. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *The New England journal of medicine.* 2015;373(18):1697-708. Epub 2015/10/29.
180. Loukola A, Chadha M, Penn SG, Rank D, Conti DV, Thompson D, et al. Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CYP17A1, CYP3A4, and SRD5A2. *European journal of human genetics : EJHG.* 2004;12(4):321-32. Epub 2003/10/16.
181. Salam MT, Ursin G, Skinner EC, Dessissa T, Reichardt JK. Associations between polymorphisms in the steroid 5-alpha reductase type II (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urologic oncology.* 2005;23(4):246-53. Epub 2005/07/16.
182. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, Mangin P, Cormier L, Fournier G, et al. Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors. *European urology.* 2007;52(4):1082-7. Epub 2007/04/24.
183. Soderstrom T, Wadelius M, Andersson SO, Johansson JE, Johansson S, Granath F, et al. 5alpha-reductase 2 polymorphisms as risk factors in prostate cancer. *Pharmacogenetics.* 2002;12(4):307-12.
184. LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, Scher H, Scardino P, Reuter V, et al. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res.* 2002;62(15):4499-506.

185. Chandran UR, Ma C, Dhir R, Bisceglia M, Lyons-Weiler M, Liang W, et al. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC cancer*. 2007;7:64. Epub 2007/04/14.
186. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(5):2815-25. Epub 2006/03/03.
187. Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S. Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers*. 2017;9(3).
188. Li H, Wang Z, Tang K, Zhou H, Liu H, Yan L, et al. Prognostic Value of Androgen Receptor Splice Variant 7 in the Treatment of Castration-resistant Prostate Cancer with Next generation Androgen Receptor Signal Inhibition: A Systematic Review and Meta-analysis. *European urology focus*. 2017. Epub 2017/07/30.
189. Markowski MC, Silberstein JL, Eshleman JR, Eisenberger MA, Luo J, Antonarakis ES. Clinical Utility of CLIA-Grade AR-V7 Testing in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JCO Precis Oncol*. 2017;10(17):30.
190. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic acids research*. 2015;44(D1):D380-D4.
191. Shiota M, Fujimoto N, Yokomizo A, Takeuchi A, Itsumi M, Inokuchi J, et al. SRD5A gene polymorphism in Japanese men predicts prognosis of metastatic prostate cancer with androgen-deprivation therapy. *Eur J Cancer*. 2015;51(14):1962-9. Epub 2015/07/15.
192. Torkko KC, van Bokhoven A, Mai P, Beuten J, Balic I, Byers TE, et al. VDR and SRD5A2 polymorphisms combine to increase risk for prostate cancer in both non-Hispanic White and Hispanic White men. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(10):3223-9. Epub 2008/05/17.
193. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, D'Amico AV, Davis BJ, Dorff T, et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(5):479-505. Epub 2019/05/16.
194. Zeng XT, Su XJ, Li S, Weng H, Liu TZ, Wang XH. Association between SRD5A2 rs523349 and rs9282858 Polymorphisms and Risk of Benign Prostatic Hyperplasia: A Meta-Analysis. *Frontiers in physiology*. 2017;8:688. Epub 2017/09/29.
195. Gu X, Na R, Huang T, Wang L, Tao S, Tian L, et al. SRD5A1 and SRD5A2 are Associated with Treatment for Benign Prostatic Hyperplasia with the Combination of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors and  $\alpha$ -Adrenergic Receptor Antagonists. *Journal of Urology*. 2013;190(2):615-9.
196. Ryl A, Rotter I, Grzywacz A, Malecka I, Skonieczna-Zydecka K, Grzesiak K, et al. Molecular Analysis of the SRD5A1 and SRD5A2 Genes in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia with Regard to Metabolic Parameters and Selected Hormone Levels. *International journal of environmental research and public health*. 2017;14(11). Epub 2017/10/31.
197. Choubey VK, Sankhwar SN, Carlus SJ, Singh AN, Dalela D, Thangaraj K, et al. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of benign prostatic hyperplasia but not prostate cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(3):1033-6. Epub 2015/03/05.
198. Gu X, Na R, Huang T, Wang L, Tao S, Tian L, et al. SRD5A1 and SRD5A2 are associated with treatment for benign prostatic hyperplasia with the combination of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors and alpha-adrenergic receptor antagonists. *J Urol*. 2013;190(2):615-9. Epub 2013/03/19.
199. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1603-7.

200. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European urology*. 2003;44(1):8-15.
201. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubner B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(11):1028-38. Epub 2014/09/04.
202. Martinez-Nava GA, Gomez R, Burguete-Garcia AI, Vazquez-Salas RA, Ventura-Bahena A, Torres-Sanchez L. BRCA1 and VDR gene polymorphisms are associated with prostate cancer risk in Mexican men. *Molecular carcinogenesis*. 2020;59(6):629-39. Epub 2020/03/29.