



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Universidad de Granada

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES
(CTCs)
COMO HERRAMIENTA
PRONÓSTICA Y PREDICTIVA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA**

IGNACIO PUCHE SANZ

Tesis doctoral

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ignacio Puche Sanz
ISBN: 978-84-9163-734-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48977>

D. José Manuel Cózar Olmo, director de la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

Dña. M^a José Serrano Fernández, directora del grupo de “Biopsia Líquida y Metástasis” en el centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo), e Investigadora Senior en la UGC de Oncología Médica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

Certifican que:

IGNACIO PUCHE SANZ, Licenciado en Medicina y Facultativo Especialista de Área en Urología, ha realizado la Tesis Doctoral “**Identificación y caracterización de células tumorales circulantes (CTCs) como herramienta pronóstica y predictiva en pacientes con cáncer de próstata**”, en colaboración conjunta entre el Hospital Universitario Virgen de las Nieves y el centro Genyo, para aspirar al Título Oficial de Doctor en Medicina Clínica y Salud Pública, por la Universidad de Granada.

Este trabajo reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado.

En Granada, a 16 Octubre de 2017

Dr. D. J.M. Cózar Olmo

Dra. Dña. M.J. Serrano Fernández

Doctorando

El doctorando **Ignacio Puche Sanz** y los directores de la tesis:

D. José Manuel Cózar Olmo y Dña. M^a José Serrano Fernández

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

El trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la supervisión de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 16 Octubre de 2017

Dr. D. J.M. Cózar Olmo

Dra. Dña. M.J. Serrano Fernández

Doctorando

A mis padres, M^a Carmen y Antonio

A Carmen, Lucía y Alejandro.

Agradecimientos:

Al **Dr. José Manuel Cózar**, por depositar en mí su confianza para llevar a cabo este proyecto desde su inicio, por transmitirme su abierta mentalidad científica y por su continua dedicación personal para colocar a la urología en el plano científico que merece.

A la **Dra. M^a José Serrano**, por haberme descubierto el apasionante mundo de la biopsia líquida, por su perseverante y comprensivo apoyo, por haber sido capaz de personificar el puente perfecto entre el laboratorio y la clínica, y por confiar siempre en mí para este proyecto.

A mis padres, **M^a Carmen y Antonio**, porque solo ellos, a través de una motivación ciega e incondicional desde que nací, son los responsables de mi actitud hacia la vida, de querer siempre encontrar respuestas y de haber despertado mi curiosidad por la ciencia.

A **Carmen y Lucía**, por ser el combustible permanente de mi día a día, por haber sido las únicas capaces de encender la luz cuando ésta se había apagado, y por dar sentido a todas mis acciones.

Índice

ÍNDICE

I.- Abreviaturas	1
II.- Resumen de la tesis	5
A.- INTRODUCCIÓN	11
A1.- CÁNCER DE PRÓSTATA (CAP)	13
<i>A1.1.- Epidemiología e historia natural.</i>	13
<i>A1.2.- Diagnóstico y screening precoz.</i>	15
<i>A1.3.- Grupos de riesgo y Medicina Personalizada en CaP.</i>	19
A1.3.1.- Tratamiento inicial con intención curativa.	21
✓ Prostatectomía radical	21
✓ Radioterapia externa	23
A1.3.2.- Nuevas herramientas terapéuticas: Vigilancia activa y terapia focal.	31
✓ Vigilancia activa	32
✓ Terapia focal	39
A1.3.3.- Nuevas herramientas pronósticas	47
✓ Test genéticos.	47
✓ Nomogramas y modelos predictivos.	53
A2.- CARCINOGENÉISIS Y MODELO METASTÁSICO DEL CAP.	69
<i>A2.1.- Latencia celular o “dormancy”</i>	69
<i>A2.2.- Transición epitelio mesénquima (EMT)</i>	74
A3.- BIOPSIA LÍQUIDA EN CAP. CONOCIMIENTO ACTUAL.	81
<i>A3.1.- Concepto de biopsia líquida:</i>	81
<i>A3.2.- Tipos de biopsia líquida</i>	83
A3.2.1.- Células circulantes de tumor (CTCs).....	83
✓ Sistemas detección de CTCs	87
✓ CTCs y cáncer de prostata.	91
✓ Caracterización biológica de las CTCs	101
✓ Importancia del EGFR en CaP.	109
✓ Receptor de andrógenos en CaP.	115
A3.2.2.- ADN libre circulante (<i>cell-free tumor DNA o ctDNA</i>).....	123
✓ ctDNA y cáncer de próstata:	126
A3.2.3.- ¿CTCs vs ctDNA?.....	129
A3.2.4.- Exosomas y AR-V7.	133

B.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	137
B1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	139
B2.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:	140
B3.- MEDIDA DE RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	147
C.- RESULTADOS	149
C1.- ENUMERACIÓN DE CTCs	151
C2.- DETECCIÓN DE RA EN LAS CTCs.....	152
C3.- CTCs COMO MARCADORES DIAGNÓSTICOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA.	152
C4.- EXPRESIÓN DE EGFR Y RA EN EL TEJIDO VS PRESENCIA DE CTCs.....	153
C5.- GENOTIPO SNPs VS PRESENCIA DE CTCs.....	154
D.- DISCUSIÓN.....	157
E.- CONCLUSIONES	165
F.- REFERENCIAS.....	169
G.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS:.....	187

I.- Abreviaturas

Abreviaturas:

- AEU: Asociación Española de Urología
- AR: Androgen Receptor, receptor de andrógenos
- AUA: American Urology Association
- BA: Bloqueo Androgénico
- BCR: Biochemical recurrence, recidiva bioquímica
- CaP: Cáncer de Próstata
- CK: Citoqueratina
- COLD: Cryo On-Line Database
- CPRC: Cáncer de Próstata Resistente a Castración
- CTC: Circulating Tumor Cell
- EAU: European Association of Urology.
- ECA: Ensayo controlado aleatorizado
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
- EMT: Transición epitelio-mesénquima
- FISH: Hibridación fluorescente in situ
- FLA: Focal Laser Ablation
- HIFU: High Intensity Focal Ultrasound
- IMRT: Intensity Modulated Radiotherapy
- ISLB: International Society of Liquid Biopsy
- MET: Transición mesénquima-epitelial
- MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Centre
- NCCN: National Cancer Comprehensive Network
- PIVOT: Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial
- PCCs: Células Progenitoras Cancerosas
- PR: Prostatectomía radical
- PSA: Prostate specific antigen, antígeno prostático específico
- PSA-DT: PSA doubling time
- RMN-MP: Resonancia Magnética Nuclear MultiParamétrica
- RNCP: Registro Nacional de Cáncer de Próstata.

- RTE: Radioterapia externa
- SG: Supervivencia global
- SIBL: Sociedad Internacional de Biopsia Líquida
- SLP: Supervivencia libre de progresión
- SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
- SPCG-4: Scandinavian Prostate Cancer Group Study Number 4
- TDA: Terapia de Deprivación Androgénica
- TF: Terapia focal
- TKI: Tirosin quinase inhibitors, inhibidores de la tirosín quinasa.
- VA: Vigilancia activa
- 3D CRT: Radioterapia Conformacional 3D

II.- Resumen

En primer lugar, con objeto de generar una idea inicial global del contenido y resultados de este proyecto, trataremos de condensar brevemente en las siguientes líneas la información más destacada de esta tesis doctoral:

El cáncer de próstata (CaP) constituye un claro ejemplo de la necesidad de nuevos biomarcadores y de la importancia del desarrollo de la biopsia líquida. El CaP se caracteriza por una **historia natural heterogénea**, probablemente debido a distintos cambios genéticos y selecciones clonales a lo largo de su evolución y de su tratamiento. Además, mientras que en otras neoplasias la biopsia del tejido tumoral primario, o de sus metástasis, permiten descifrar biomarcadores pronósticos y predictivos con más facilidad, **la principal metástasis del CaP es al hueso**, lo cual supone una importante barrera en la obtención de muestras para su análisis y monitorización molecular. La biopsia líquida, a través del análisis de células circulantes del tumor (CTCs), se plantea como una potencial solución a estos problemas.

Las CTCs han demostrado de manera contundente su valor como marcadores pronósticos independientes en el CaP metastásico. Sin embargo, hasta la fecha se han realizado muy pocos estudios que analicen el papel de las CTCs en el **CaP localizado**, debido principalmente a la baja tasa de detección de estas células en los momentos iniciales de la enfermedad. No obstante, pensamos que la literatura a este respecto es escasa y muy heterogénea y que la baja tasa de detección puede ser debida a una tecnología todavía con margen de optimización. Sobre este escenario, planteamos un estudio, basado en la práctica clínica habitual urológica, con el objetivo de tratar de comprender mejor el potencial pronóstico de las CTCs en el momento diagnóstico del CaP. Del mismo modo, también tratamos de identificar distintas subpoblaciones celulares de CTCs en el momento inicial de la enfermedad.

Para este estudio se incluyeron pacientes con sospecha clínica de CaP e indicación de biopsia prostática diagnóstica según un screening individual de PSA (PSA > 4ng/mL con cociente PSA l/t <20%). Las muestras sanguíneas para el análisis de CTCs se obtuvieron inmediatamente antes de realizar la biopsia. Además, también determinamos

conocidos marcadores de CaP (receptor de factor de crecimiento epidérmico o EGFR, y receptor de andrógenos o RA) en el tejido prostático y distintos polimorfismos genéticos de cambio de nucleótido único (SNPs) en la sangre de los pacientes. Posteriormente, analizamos las relaciones de todos ellos con la presencia de CTCs.

Las CTCs se aislaron mediante técnica inmunomagnética empleando anticuerpos anti-citoqueratina específicos y siguiendo el protocolo específico de nuestro grupo. Para identificar distintas subpoblaciones de CTCs se estudió la expresión o no de RA en estas células. La expresión de EGFR y RA en el tejido se realizó mediante Real-Time PCR. Se seleccionaron 8 SNPs (rs56250729, rs486907, rs627928, rs11545302, rs17552022, rs5030739, rs4792311 y rs3747531) por su relación con el CaP y su prevalencia en población caucásica.

Un total de 86 pacientes fueron incluidos para el estudio y se obtuvo una tasa de detección de CTCs del 18.6%. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la presencia de CTCs para detectar cáncer de próstata fueron de 14.2%, 78.4%, 31.2% y 57.4%, respectivamente. La mayoría de las CTCs (75%) fueron CTC RA-negativas.

Observamos una relación inversa, no significativa estadísticamente, entre la expresión de EGFR en el tejido y la expresión de RA en las CTCs. No obstante, este resultado a nivel clínico es congruente con evidencias experimentales previas, que muestran una relación inversa entre el EGFR y el RA en las CTCs. De forma muy interesante, comprobamos una relación directa, esta vez sí estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre la expresión de RA en el tejido prostático y la presencia de CTCs en sangre periférica. Este resultado también está sustentado por evidencia reciente a nivel experimental, que ha demostrado como los andrógenos son capaces de inducir procesos EMT en líneas celulares de CaP, lo cual es un paso fundamental para adquirir la capacidad de migración y potencial invasión a distancia. Por ello, nuestros resultados sugieren que un incremento en la expresión de RA en la próstata podría ser un facilitador del proceso de diseminación celular

a sangre periférica. Probablemente dado el bajo tamaño muestral, no encontramos ninguna asociación significativa entre los SNPs y las CTCs.

Como conclusiones, podríamos resumir que:

✓ La **baja tasa de detección de CTCs en el CaP localizado** limita su papel como marcador diagnóstico. Sin embargo, en este trabajo de tesis hemos demostrado que estas células pueden proporcionar **valiosa información pronóstica y/o predictiva**, ya que se pueden detectar distintas subpoblaciones de CTCs (RA-positivas o RA-negativas) incluso en los primeros momentos tras el diagnóstico de la enfermedad.

✓ **El RA parece guardar una relación íntima con el proceso de diseminación de las CTCs.** Teniendo en cuenta que a vía de los andrógenos es la principal diana terapéutica de esta enfermedad, creemos que nuestros resultados justifican profundizar la investigación con CTCs en estadio localizado de CaP. No obstante, dada la baja tasa de detección, es preciso ampliar las cohortes de pacientes e ir más allá de su mera enumeración, estudiando nuevas formas de caracterización que aporten valor predictivo y pronóstico a estas células.

✓ Los biomarcadores circulantes (básicamente CTCs y también ctDNA) hicieron su aparición hace 10 años y, desde entonces, el desarrollo de nuevas técnicas de detección y la publicación de resultados traslacionales han crecido a un ritmo exponencial. A pesar de ello, aún no han sido capaces de hacerse un hueco en la práctica clínica habitual. Probablemente, esto sea debido precisamente a la desbordante y heterogénea cantidad de información disponible. Resulta muy complejo reproducir de los resultados de los distintos estudios, e igualmente difícil compararlos sistemáticamente para poder llegar a conclusiones de impacto clínico fiables. Por ello, es necesario el **consenso** y la **unificación de criterios**. En este sentido, resultan de enorme importancia la aparición de sociedades científicas como la International Society of Liquid Biopsy (ISLB) que promocionen encuentros de consenso específicos y que faciliten el co-working y la investigación colaborativa.

A.- INTRODUCCIÓN

A1.- Cáncer de próstata (CaP)

A2.- Carcinogénesis y modelo metastásico del CaP

A3.- Biopsia líquida en cáncer de próstata. Conocimiento actual.

A1.- Cáncer de próstata (CaP)

A1.1.- Epidemiología e historia natural.

El cáncer de próstata (CaP) es la neoplasia no cutánea más frecuente en el varón y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en los hombres del mundo occidental. En Europa, representa aproximadamente el 12% de los casos de cáncer de nuevo diagnóstico, siendo el más común en hombres de edad avanzada (1).

En EEUU se diagnostican en torno a 233.000 casos anuales y, en 2016 murieron por CaP casi 30.000 pacientes. El riesgo general de morir por CaP en un varón es menor del 3%. La mayoría de los fallecimientos a causa del CaP (70%) ocurren en varones mayores de 75 años. El 28% de las muertes se producen en varones con edades comprendidas entre 55 y 74 años; y el 2% restante se producen en varones menores de 55 años (2).

A nivel nacional, la Asociación Española de Urología (AEU) y el Grupo Español de Cáncer de Próstata (GESCAP), pusieron en marcha en 2010 el **Registro Nacional de Cáncer de Próstata (RNCP)**. Este registro recoge de forma sistemática, por primera vez, la información epidemiológica de esta enfermedad en nuestro país. Según los datos del RNCP, la incidencia de cáncer de próstata en España se acerca a los 20.000 nuevos casos al año, representando más de 80 casos por cada 100.000 habitantes/año. El 71% de los pacientes tienen más de 65 años en el momento del diagnóstico; sin embargo, hasta un 14.6% de los pacientes tienen menos de 60 años. Solo un 4% de los pacientes se diagnostican con enfermedad ya diseminada y en un 90% la enfermedad está clínicamente localizada, siendo un 37% neoplasias de grado bajo de riesgo, el 23% de riesgo intermedio y el 28% de alto riesgo (3).

	% SLP 3 años	% SG 3 años
Localizado	84.3% (89.5-91.6)	94.9% (94.2-95.7)
Avanzado	75.6% (68.9-80.8)	84.9% (80.4-89.7)
Metastásico	30% (23.5-38.4)	50.5% (43.3-59)

Tabla 1. Supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) en el seguimiento a tres años según datos del Registro Nacional de Cáncer de Próstata (3).

Los pacientes con CaP de bajo grado presentan una tasa de mortalidad <10% a los 10 años. Si son diagnosticados en estadio localizado, la tasa de supervivencia es casi del 100% en la actualidad (3).

Los pacientes con enfermedad intermedia tienen un 13% de mortalidad específica y una probabilidad del 40% de progresión a los 10 años. Por su parte, los pacientes con enfermedad de alto grado tienen un 60% de tasa de mortalidad.

De forma general, el 40% de los pacientes presentará en algún momento de la evolución una progresión de la enfermedad, y el 17% desarrollarán enfermedad generalizada metastásica. Una vez la enfermedad se hace ósea metastásica, la tasa de mortalidad asciende al 75% a los 5 años y al 80% a los 10 años.

Cuando se entra en fase de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) la supervivencia media clásica ha sido de 18-24 meses, si bien los nuevos tratamiento disponibles están ampliando estas cifras (1).

A1.2.- Diagnóstico y screening precoz.

Desde hace más de 20 años, el antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés) ha constituido la piedra angular del screening, diagnóstico y seguimiento del CaP. No obstante, la determinación del **PSA** presenta una **baja especificidad** para el diagnóstico de la enfermedad, lo cual hace imprescindible la realización de una biopsia prostática y el examen anatomopatológico del tejido para poder establecer el diagnóstico definitivo de CaP. El screening o cribado del CaP consistiría en la determinación sistemática del PSA en una población sin síntomas de la enfermedad; no obstante, como veremos, actualmente la implementación de un programa de screening en CaP es motivo de bastante controversia.

En general, existen dos tipos de cribado: el **cribado poblacional**, en varones asintomáticos (en riesgo), que suele llevarse a cabo como parte de un estudio y es iniciado por el encargado del cribado; y el **cribado individual**, oportunista o detección precoz, que conlleva la búsqueda de casos individuales, y es iniciado por el propio paciente o por su médico.

El objetivo principal de un programa de screening es el de reducir la prevalencia de la enfermedad y su mortalidad específica; pero también tiene como objetivo, mejorar la calidad de vida del paciente afecto.

Es del todo cierto que, hasta la fecha, los programas de screening basados en el PSA han aumentado la detección del cáncer de próstata. Sin embargo, también existe gran evidencia que demuestra que un gran porcentaje de los varones diagnosticados de CaP presentan tumores indolentes, que no progresarán y no provocarán complicación alguna a estos pacientes en el resto de su vida. Es más, el hecho de tratar a estos pacientes puede estar provocando una merma innecesaria en su calidad de vida, debido a los efectos secundarios de los tratamientos empleados. A esta situación se le ha denominado “**sobrediagnóstico**” y “**sobretratamiento**” (4). Aunque es difícil estimar la magnitud del sobrediagnóstico asociada a un programa de screening para diagnóstico y tratamiento del

CaP, se estima que la tasa debe oscilar oscila entre el 17% y el 50%, respectivamente (5).

La eficiencia del screening poblacional y/o individual en el cáncer de próstata es motivo de gran controversia y debate en la comunidad científica general y urológica en particular. Por ello, creemos preciso, para poder explicar correctamente al paciente la pertinencia de realizar una determinación de PSA y sus consecuencias, es conveniente conocer todo el conjunto de datos procedentes de los ensayos controlados aleatorios (ECAs) y la evidencia científica sobre el cribado del cáncer de próstata. En los siguientes párrafos repasaremos brevemente la evidencia publicada más relevante, para comprender el conocimiento actual acerca del screening del CaP.

En 2010, un importante metaanálisis de seis ECAs, que incluyó un total de 387.286 pacientes, concluyó que el screening de CaP basado en PSA no reducía significativamente la mortalidad específica por esta enfermedad y abogaba por no recomendar el screening rutinario (6). Años después, se publicaron nuevos datos de los estudios incluidos en dicho metaanálisis, debido a la ampliación del tiempo de seguimiento de los pacientes. De esos estudios, los dos más relevantes son el **PLCO** (US Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Screening Trial) (7) y el **ERSPC** (European Randomized Study of Screening Prostate Cancer) (8). La reciente publicación de los datos actualizados de ambos estudios sigue sin despejar, de forma clara, la duda de si el programa de screening basado en el PSA es clínicamente eficiente para el paciente o no. Basicamente, sus diferencias son las siguientes:

- El **estudio PLCO** (7), realizado en EE.UU., asignó aleatoriamente a 76.693 hombres y comparando una atención estándar sin PSA (grupo control) frente a una estrategia de screening intenso (PSA anual y tacto rectal los primeros 4 años con punto de corte en 4 ng/ml).
 - ✓ No ha demostrado una reducción en la mortalidad por CaP en 13 años de seguimiento. La incidencia de muerte por cada 10.000 personas/año fue de 2.0 (50 muertes) en el grupo de cribado y 1.7 (44 muertes). Razón de

tasas: 1.13.

- ✓ Conclusión: la mortalidad relacionada con CaP en individuos detectados mediante screening fue muy baja y no significativamente diferente entre los dos grupos de estudio.
- El **estudio ERSPC** (8), realizado en Europa, estudió a 7408 casos vs 6.107 controles sin screening con una mediana de seguimiento de 13 años.
 - ✓ Si ha demostrado una reducción de mortalidad del 50%, lo que supone una reducción de 1.07 muertes por cada 1.000 varones. La incidencia acumulada de CaP fue del 8.2% en el grupo de cribado y el 4.8% en el grupo control.
 - ✓ Conclusión: tendrían que someterse al screening 781 hombres y necesitarían ser tratados 27 casos de CaP para prevenir 1 muerte por esta causa.
 - ✓ El beneficio real del screening sería evidente solo después de 10 a 15 años de seguimiento. Este beneficio procedería, sobre todo, de la reducción en un 41% en la tasa de metástasis para el brazo del screening.

Es importante reseñar que estos resultados del ERSPC estuvieron fuertemente influenciados por los resultados de 2 países,; y que en 5 de los 7 países del estudio no se encontraron diferencias significativas en la reducción de muertes entre los pacientes sometidos al screening frente a los que no.

Ambos estudios (PLCO y ERSPC) coinciden en un hecho de forma clara: el **aumento significativo de los casos de cáncer de próstata diagnosticados** en el grupo del screening en comparación con el grupo control. Si bien las discrepancias entre los resultados de estos dos estudios pueden deberse a diferencias en el diseño y ejecución, los datos actuales parecen inclinar la balanza hacia un posible beneficio del screening poblacional del CaP, siempre recordando que se acompaña de una serie de efectos adversos relacionados tanto con el diagnóstico como con el tratamiento.

Sobrediagnóstico:

El test de PSA es poco específico y produce falsos positivos. Aproximadamente el 80% de los PSA positivos resultan ser falsos positivos cuando el punto de corte está entre 2.5 y 4 ng/ml. Estos pacientes con PSA falsamente positivos se someterán a 1 o más biopsias prostáticas, con sus conocidos efectos secundarios.

Hasta el 15%-20% de los varones con PSA aumentado se someterán a una biopsia de próstata en los 10 años siguientes a su detección. Hasta un tercio de esas biopsias presentarán complicaciones moderadas o graves derivadas (dolor, fiebre, hematuria, rectorragia y disuria); y además, hasta un 1% de ellos requerirá hospitalización (9).

Sobret ratamiento:

El 90% de los CaP detectados por aumento de PSA se someterán a un tratamiento precoz basado en la cirugía, la radioterapia o el bloqueo hormonal (10). Todas estas opciones terapéuticas tienen importantes y frecuentes efectos secundarios como disfunción eréctil, incontinencia urinaria, complicaciones quirúrgicas, rectitis y cistitis r ádicas, complicaciones cardiovasculares y un largo etcétera. Muchos de estos pacientes se estarán sometiendo a estos procedimientos sin necesitarlo, ya que se sabe que muchos de los CaP diagnosticados durante el screening son indolentes y no producirán ninguna complicación. Sin embargo, en la actualidad no existe ninguna herramienta predictiva capaz de distinguir qué tumores son cl ínicamente más agresivos y cuales son cl ínicamente indolentes.

A1.3.- Grupos de riesgo y Medicina Personalizada en CaP.

Como se ha indicado anteriormente, según los datos del RNCP (3), en España se detectan unos 20.000 nuevos casos de CaP al año, y en el **90%** de los casos la enfermedad se diagnostica en fase localizada frente a sólo un **4%** que se diagnostica en fase diseminada o metastásica.

Clásicamente, los pacientes con cáncer de próstata se pueden dividir en tres grupos clínicos fundamentales o **grupos de riesgo de D'Amico**:

Bajo riesgo	PSA < 10ng/mL, T1c-T2a, Gleason < 7.
Riesgo intermedio	PSA ≥ 10 pero < 20 ng/mL, T2b, Gleason = 7
Alto riesgo	PSA ≥ 20 ng/mL, ≥ T2c, Gleason > 7

Tabla 2. Clasificación de riesgo del CaP según grupos de riesgo de D'Amico.

A pesar de ser la forma de clasificación más extendida y utilizada, diversos estudios han puesto ya de manifiesto que esta categorización en tres grupos de riesgo no es precisa ni adecuada. En general, ésta y otras clasificaciones clínicas en CaP **tienden a englobar** dentro de un mismo grupo a **subgrupos biológicamente muy heterogéneos** de pacientes y, aunque el CaP localizado suele tener una evolución lenta e indolente, existe un riesgo significativo de que la enfermedad sea agresiva y se convierta en metastásica. Además, los efectos de los tratamientos pueden ser graves y limitantes para la calidad de vida del paciente, sobre todo los referidos a la esfera sexual y la continencia de orina.

De acuerdo con la evidencia clínica actual, una clasificación clínica, única y categorizada, para elegir el tratamiento de los pacientes con CaP no parece la opción más eficiente (11). Este hecho, junto con la preocupación acerca del sobrediagnóstico y

sobret ratamiento han potenciado el desarrollo de nuevas subclasificaciones, nomogramas, nuevas formas de diagnóstico y nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a la individualización del manejo del paciente.

Dada su importancia clínica actual, y su relación con la **medicina de precisión y personalizada**, creemos conveniente repasar en detalle estas nuevas formas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

A1.3.1.- Tratamiento inicial con intención curativa.

✓ *Prostatectomía radical*

Actualmente la cirugía radical es **el único tratamiento** para el cáncer de próstata localizado **que ha demostrado un beneficio en supervivencia global** (SG) y supervivencia cáncer específica (SCE) en un ensayo clínico prospectivo aleatorizado al compararse con una actitud conservadora (12).

A lo largo de 23.2 años de seguimiento, el ensayo **SPCG-4** (12) demostró que la PR se asoció a una reducción de todas las causas de muerte. El riesgo relativo de muerte a los 18 años fue de 0.71 (95% CI, 0.59-0.86). El número necesario de pacientes a tratar (NNT) para evitar una muerte por cáncer de próstata a los 18 años fue de 8 pacientes. Esta cantidad se reducía a 4 pacientes cuando se trataba de pacientes menores de 65 años. La PR se asoció también a una reducción de la mortalidad específica por cáncer de próstata a los 18 años (RR = 0.56; 95% CI, 0.41-0.77). Igualmente, el beneficio de la cirugía con respecto a la mortalidad específica fue mayor en los pacientes menores de 65 años y en aquellos de riesgo intermedio. No obstante, en pacientes de mayor edad, la PR se asoció a una disminución de las metástasis.

Posteriormente, el estudio **PIVOT** (13), otro ensayo prospectivo aleatorizado, no consiguió demostrar los beneficios de la PR sobre la SG y la SCE en el conjunto de su serie (edad media 67 años). Tras una mediana de seguimiento de 10 años, la PR no redujo de forma significativa la mortalidad por cualquier causa (HR = 0.88; 95% CI, 0.71-1.08) ni la mortalidad cáncer específica (HR = 0.63; 95% CI, 0.36-1.09).

A modo resumen del estudio PIVOT se puede decir que:

- En los pacientes de riesgo intermedio, la PR redujo la mortalidad por cualquier causa (HR = 0.69; 95% CI, 0.49-0.98).

- En los pacientes de alto riesgo, la PR no redujo la mortalidad por cualquier causa (HR = 0.40; 95% CI, 0.16-1.00).

- En los pacientes con PSA > 10, la PR redujo la mortalidad por cualquier causa (HR = 0.67; 95% CI, 0.48-0.94).

Estudio	Mediana seguimiento	Categoría riesgo	SCE a los 18 años
SPCG-4 (12)	160 meses	Bajo-Intermedio	84.9%
PIVOT (13)	120 meses	Bajo-Intermedio	94.2%

Tabla 3. Diferencias en términos de Supervivencia Cáncer específica (SCE) entre los dos principales ensayos clínicos sobre prostatectomía radical hasta la fecha.

✓ *Radioterapia externa*

Los progresos tecnológicos en la captación de imagen y en la digitalización de la misma han permitido, en los últimos 10 años, el desarrollo de la **radioterapia conformacional 3D (3D-CRT)** y, posteriormente, la aparición de la **radioterapia conformacional con intensidad modulada (IMRT)**.

Estos avances facilitan, en definitiva, administrar una mayor dosis total de irradiación con una distribución espacial ajustada (*conformada*) de forma muy precisa al volumen tumoral, respetando los órganos sanos en la vecindad.

La **Radioterapia Conformada** se basa en 3 principios:

- 1.- Administración de mayor dosis en zona tumoral, con lo que se consigue mejor control locoregional.
- 2.- Aumento progresivo de la administración de dosis (escalada de dosis), con lo que se consigue mejor control del tumor y mayor tasa de supervivencia.
- 3.- Disminución de afectación de tejido sano con menor incidencia de toxicidad aguda y tardía.

A diferencia de la cirugía radical, para la radioterapia no existen hasta la fecha ensayos clínicos aleatorizados que comparen ésta con la actitud expectante o la vigilancia activa. El único ensayo clínico aleatorizado reciente es el estudio **PROTECT** (vigilancia activa frente a prostatectomía radical frente a radioterapia) que todavía no ha dado a conocer sus resultados definitivos.

En cualquier caso, la **IMRT constituye actualmente el gold estándar** de radioterapia externa y, según las recomendaciones de la Asociación Europea de Urología, todos los centros que no la hayan incluido aún deberían tener un plan para ello.

Diferencias entre 3D-CRT y IMRT.

El concepto de radioterapia conformacional 3D (3D-CRT) ha sustituido a las planificaciones realizadas antes en solo dos dimensiones. La **3D-CRT** conlleva la delimitación de volúmenes tumorales y órganos de riesgo en cada uno de los cortes de la prueba de imagen que se utilice (generalmente TAC), siendo estos volúmenes necesarios para la planificación del tratamiento radioterápico, realizándose una optimización en la distribución de dosis en el órgano diana mediante un moldeado de los campos de tratamiento (conformación de los campos de tratamiento) al volumen tumoral dibujado en las imágenes de TAC.

Sin embargo, a pesar de las prometedoras experiencias iniciales recogidas con los tratamientos 3D-CRT, se sabe que aproximadamente un 30% de los pacientes tratados con estas técnicas recidivarán. Esta alta tasa de recidivas se justifica por la existencia de subpoblaciones de clones tumorales resistentes a las dosis máximas que se pueden administrar con los tratamientos radioterápicos convencionales (65-70Gy), debido fundamentalmente a los límites de tolerancia de los tejidos sanos que rodean al volumen blanco tumoral.

Por ello, incluso antes de que la 3D-CRT convencional se impusiera de forma generalizada, empezó a surgir un nuevo tipo de planificación y administración de tratamiento con radioterapia conformada, la denominada radioterapia de intensidad modulada (IMRT).

La **IMRT** permite una distribución de las dosis de radiación 3D y conformal. Esto permite mejorar la adecuación de la distribución de dosis por una adaptación a los volúmenes complejos y una mayor homogeneización, predefinida según el volumen diana anatómico-clínico. Así se optimiza la radiación sobre el tejido tumoral, a la vez que se disminuye la radiación del tejido sano circundante limitando la morbilidad asociada. Con IMRT se puede plantear casi cualquier distribución de la dosis de irradiación con una abrupta caída de la misma en los límites entre el volumen del tumor y los tejidos sanos en

vecindad, reduciéndose en dichos tejidos tanto la dosis final como el volumen de irradiación.

Por tanto, la ventaja fundamental que aporta la 3D-CRT en su modalidad de IMRT es la **reducción del volumen de tejido sano expuesto a dosis altas** de irradiación, lo cual nos permite **conseguir una escalada de dosis a nivel del tumor**.

Hasta la fecha, ningún estudio aleatorizado ha comparado los resultados de la escalada de dosis entre la 3D-CRT convencional y la IMRT.

Escalada de dosis

Actualmente, la mayoría de pacientes que se tratan con radioterapia externa reciben una dosis escalada fraccionada de forma convencional (*dose-escalated conventionally fractionated radiation therapy o CFRT*) que consiste básicamente en una **fracción única diaria de 1.8-2.0 Gy durante 1 hora, 5 días a la semana, durante 8 semanas, hasta llegar a un total de 76-80 Gy**.

En este caso sí que varios estudios aleatorizados han demostrado que la escalada de dosis (74-80 Gy) tiene un impacto significativo en la supervivencia libre de progresión bioquímica a lo 5 años (14). No obstante, estos estudios incluyen a pacientes de distintas categorías de riesgo, y la adición de bloqueo androgénico es muy variable. Además, ningún estudio ha mostrado que escalar las dosis produzca un impacto en la supervivencia global.

De acuerdo a las directrices de la Asociación Europea de Urología, en la práctica habitual, la dosis mínima recomendada para el cáncer de próstata de bajo riesgo debería de ser de 74 Gy (*nivel de evidencia 1a grado, de recomendación A*), no siendo posible realizar distintas recomendaciones para cada grupo de riesgo.

Hipofraccionamiento

Los avances tecnológicos en los últimos años han permitido una nueva vuelta de tuerca a la forma de aplicación de la dosis radioterápica con esta nueva estrategia de dosificación que va generando resultados cada vez más prometedores desde hace algún tiempo. El hipofraccionamiento consiste en la aplicación, muy altamente conformada, de elevadas dosis de radiación diarias (**desde 2.5 hasta 10 Gy por fracción**).

De nuevo, la base teórica de esta modalidad se sustenta en el bajo cociente α / β del cáncer de próstata, que difiere del resto de tumores en otros órganos. El fraccionamiento clásico, explicado en el punto anterior, genera un daño en el ADN que en última instancia provocará una apoptosis, fallo de la mitosis o senescencia celular. Un cociente de proliferación muy lento, como es el caso del cáncer de próstata, podría facilitar una reparación del daño celular inducido a lo largo del tiempo. El punto clave, por tanto, consistiría en una elevada y suficiente dosis total sobre la neoplasia prostática. Dado que las células del cáncer de próstata tienen una proliferación muy lenta, deberían responder mejor a dosis muy elevadas por fracción (hipofraccionamiento).

Además, más allá de una radiobiología favorable, el hipofraccionamiento supondría una ventaja para el paciente, así como una probable disminución en el coste total del tratamiento, ya que se trata de menos sesiones y visitas programadas. Por todo ello, el hipofraccionamiento despierta cada vez más interés en la comunidad oncoradioterápica.

A la hora de valorar los distintos estudios existentes y por llegar, debemos saber diferenciar entre los que utilizan un **hipofraccionamiento moderado** (2.5-4 Gy por fracción) y los que emplean un **hipofraccionamiento extremo** (5-10 Gy por fracción), también conocido como radioterapia corporal estereotática (*stereotatic body radiation therapy* o *SBRT*).

Las últimas **recomendaciones** europeas ponen de relieve la evidencia creciente acerca de la eficacia y seguridad demostrada del hipofraccionamiento moderado en el

cáncer de próstata de bajo riesgo, aunque aún son necesarios datos de seguimiento a largo plazo. Por su parte, el hipofraccionamiento extremo ha mostrado datos prometedores en cuanto a control oncológico, aunque los datos de toxicidad son algo más preocupantes. La Asociación Americana de Oncólogos Radioterápicos apunta que, aunque son necesarios estudios randomizados, es viable y adecuado ofrecer el hipofraccionamiento extremo a pacientes seleccionados de riesgo bajo e intermedio. Sin embargo, a nivel europeo la recomendación es de sólo ofrecer esta modalidad a pacientes en el contexto de algún estudio protocolizado (15).

Recomendaciones de la EAU para la radioterapia externa.

Las guías de la Asociación Europea de Urología (EAU) realizan una serie de recomendaciones para el tratamiento de **cáncer de próstata localizado** mediante radioterapia externa (*external beam radiation therapy o EBRT*). Un resumen de las mismas, se incluyen en la siguiente tabla:

Bajo riesgo	IMRT con escalada de dosis y sin BA
Riesgo intermedio	Aptos para BA: IMRT con BA (4-6 meses)
	No aptos para BA: IMRT escalada de dosis (76-80 Gy) vs IMRT + BrT
Alto riesgo	IMRT con escalada de dosis + cadenas ganglionares + BA a largo plazo *

Tabla 4. *IMRT*: radioterapia de intensidad modulada. *BA*: bloqueo androgénico. *BrT*: braquiterapia
* la duración del BA debe tener en cuenta el estado general, comorbilidades y factores clínicos pronósticos (T, Gleason, PSA).

Efectos secundarios de la radiación:

La radioterapia parece afectar a la **función eréctil** en menor medida a la que lo hace la cirugía radical. En un metaanálisis se comprobó que la probabilidad de mantener la función eréctil al año del tratamiento era de 0.76 tras braquiterapia, 0.60 tras braquiterapia + radioterapia externa, 0.55 tras radioterapia externa, 0.34 tras prostatectomía radical con preservación de bandeletas y 0.25 tras prostatectomía radical clásica. Cuando dicho metaanálisis seleccionaba solo los estudios con más de 2 años de seguimiento (lo que implicaba excluir los estudios de braquiterapia) se ampliaba la diferencia entre las técnicas radioterápicas y quirúrgicas (16).

El riesgo de desarrollar **neoplasias secundarias** sobre el recto y la vejiga es significativamente mayor en los pacientes sometidos a radioterapia externa. En un estudio retrospectivo que comparó 30.552 vs 55.263 pacientes sometidos a radioterapia o PR, respectivamente, se observó que el riesgo de desarrollar cáncer de recto era 1.7 veces superior en la pacientes sometidos a RT (17). Otro estudio mostró que el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga era 2.34 veces superior que el del resto de la población sana.

En contraposición, uno de los análisis de los datos de la SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Programme*), que incluían más de 100.000 pacientes, demostró que el riesgo de neoplasias secundarias a la terapia radioterápica era bajo, del 0.16% (18).

Por su parte, el MSKCC también publicó sus datos con respecto a la toxicidad a largo plazo de la radioterapia en 1571 pacientes durante una mediana de seguimiento de 10 años. Se observó que la aparición de toxicidad aguda, tanto gastrointestinal como genitourinaria, se comportaba como predictor de dicha toxicidad a largo plazo. Además, se puso de manifiesto que la tasa de **toxicidad gastrointestinal** grado 2 fue menor para la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) que para la radioterapia conformacional tridimensional (3D-CRT) (5% para la IMRT y 13% para la 3D-CRT). La incidencia de **toxicidad genitourinaria** fue del 20% en los pacientes tratados con 81 Gy, pero se reducía al 12% en los pacientes tratados con menos dosis. La incidencia global de toxicidad gastrointestinal grado III fue de 1% y de genitourinaria de 3%. Estos datos sugerían una **ventaja de la IMRT**, la cual podía proteger frente a la aparición de toxicidad gastrointestinal. Al escalar la dosis recibida, tanto en IMRT como en IGRT, la toxicidad grado 3 a largo plazo gastrointestinal y genitourinaria varía entre un 2-3% y 2-5%, respectivamente.

A1.3.2.- Nuevas herramientas terapéuticas: Vigilancia activa y terapia focal.

Según los datos del Registro Nacional de Cáncer de Próstata, **la prostatectomía radical (PR)** es la forma más frecuente de tratamiento del CaP en nuestro país (36,89%), seguida de la radioterapia externa (RTE) (26,19%). Después seguirían la hormonoterapia (19,55%), la braquiterapia (11,75%) y la vigilancia activa (4,63%) (3). La intervención consiste en la exéresis de la totalidad de la glándula prostática entre la uretra y la vejiga, así como la resección de las vesículas seminales y, frecuentemente, la técnica se acompaña de una linfadenectomía bilateral. Independientemente del abordaje empleado, el objetivo de la PR es erradicar la enfermedad neoplásica, al tiempo que se trata de preservar la continencia y la potencia sexual.

Actualmente, la PR y la RTE son las dos únicas formas curativas de tratamiento aceptadas para el cáncer de próstata. Sin embargo, también está demostrado que a mayor cantidad de comorbilidades mayor es la probabilidad de fallecer por causas no relacionadas con el cáncer de próstata, y también están claros los frecuentes efectos adversos de ambas posibilidades terapéuticas. Por otro lado, es importante saber, que si se decide dejar a un CaP localizado diagnosticado sin un tratamiento curativo, cabe esperar una mortalidad cáncer específica a los 10 y 15 años del **13% y 19.6%**, respectivamente (19). Por tanto, es muy importante una correcta selección e **individualización del riesgo** para que la actitud conservadora no ponga en riesgo la vida del paciente.

Ante este escenario clínico, no tardaron en aparecer las siguientes preguntas: **¿y si no tratamos el cáncer de próstata y lo dejamos a su evolución natural?, o bien, ¿y si tratamos solo las lesiones tumorales, evitando tratar la glándula completa?**

Estas preguntas no tienen aún respuestas firmes, pero si existe actualmente gran cantidad de evidencia, que trataremos de resumir en los dos siguientes apartados.

✓ *Vigilancia activa*

La vigilancia activa (VA) es una de esas estrategias terapéuticas que aparece, como alternativa terapéutica **individualizada**, para evitar el temido sobrediagnóstico y sobretratamiento del CaP clínicamente indolente de diagnóstico temprano. Podemos decir que la VA constituye una forma de tratamiento del cáncer de bajo riesgo, la cual se beneficia de la lenta historia natural de la enfermedad para evitar un tratamiento agresivo.

La clave de esta estrategia es que la mayoría de hombres diagnosticados con un cáncer de bajo grado y volumen tumoral nunca tendrán ninguna manifestación clínica de la enfermedad. Sin embargo, uno de las principales críticas que se le atribuye a la VA es que también se sabe que hasta el 20% de estos pacientes, catalogados como “*bajo riesgo*”, pueden estar infradiagnosticados, debido a la presencia de enfermedad de alto grado no presente en la biopsia diagnóstica o bien, debido a la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo (19). Por ello, la VA precisa de un seguimiento estrecho (PSA, tacto rectal y biopsias) que identifique a estos pacientes y que permita tratarlos de forma temprana y eficaz.

La Asociación Americana de Urología (AUA) la Asociación Europea de Urología (EAU) y la National Comprehensive Care Network (NCCN) reflejan en sus guías a la VA como opción terapéutica para el del cáncer de próstata localizado de bajo riesgo.

De acuerdo a las **guías de la EAU** la VA a es una opción y debe realizarse en:

a. Pacientes con el **menor riesgo clínico de progresión**: (Grado recomendación A)

- ✓ expectativa de vida > 10 años,
- ✓ cT1/2,
- ✓ PSA < 10 ng/mL,
- ✓ Gleason en la biopsia < 6,
- ✓ < 2 cilindros positivos
- ✓ bajo porcentaje de afectación de los cilindros (< 50% por cilindro).

- b. El seguimiento debe basarse en el **tacto rectal**, determinaciones periódicas de **PSA** y repetición de la **biopsia**. No obstante, la periodicidad y protocolo de seguimiento óptimo no está aún definido. (Grado recomendación A)

A pesar de la evidencia existente, todavía quedan muchas dudas y puntos críticos sin respuestas (mortalidad cáncer específica a largo plazo, criterios óptimos de selección de pacientes, protocolo de seguimiento y signos de alarma para la intervención). Por ello, aunque ya constituye una opción real para determinados pacientes, sus resultados requieren aún de una validación a largo plazo, así como ser comparados con los resultados de aquellos pacientes que son sometidos al tratamiento primario curativo (PR o RTE) de su enfermedad.

Criterios de inclusión y protocolo seguimiento en VA:

Hay que saber que no existe aún un protocolo de seguimiento establecido o ampliamente consensuado para llevar a cabo la VA. Por esta razón, es de especial importancia que, cuando se ofrezca esta posibilidad, se disponga de un **protocolo detallado, previamente establecido** y acordado por el centro o unidad urológica que ofrece esta alternativa. Se debe explicar en profundidad al paciente en qué consistirá el seguimiento y la posibilidad de precisar un tratamiento a posteriori según los resultados.

Además, una vez establecido dicho protocolo, se debe valorar la posibilidad de incluir a los pacientes en estudios prospectivos de vigilancia activa. Solo a través de estos estudios prospectivos, con un protocolo de seguimiento detalladamente establecido de antemano, se hace posible la correcta valoración de los criterios de inclusión y seguimiento de estos pacientes. De esta manera, se facilitaría la creación de una plataforma de datos, capaz de valorar adecuadamente el papel de nuevos biomarcadores y pruebas de imagen en la toma de decisiones de estos pacientes; y así, en un futuro, poder optimizar y consensuar dichos criterios.

Centro	T	PSA	Gleason	Número cilindros positivos	Un solo cilindro positivo	PSA DT
Johns Hopkins (20)	≤T2a	Desconocido	≤3 + 3	≤2	≤50%	≤0.15
University Toronto (21)	Desconocido	≤10	≤3 + 3 *	Desconocido	Desconocido	-
UCSF (22)	≤T2a	≤10	≤3 + 3	≤33%	≤50%	
ERSPC (23)	≤T2a	≤10	≤3 + 3	≤2	Desconocido	≤0.2
Royal Marsden Hospital (24)	≤T2a	≤15	≤3 + 4	≤50%	Desconocido	-
MSKCC (25)	≤T2a	≤10	≤3 + 3	≤3	≤50%	-
University Miami (26)	≤T2a	≤10	≤3 + 3	≤2	≤20%	-

Tabla 5. Criterios de inclusión de los principales estudios realizados hasta la fecha sobre Vigilancia Activa.

* Antes del 2000 se incluyeron pacientes <70 años con PSA ≤15 y Gleason ≤3 + 4.

Supervivencia libre de tratamiento, mortalidad cáncer específica y mortalidad por otras causas en VA:

La mayoría de las series basan sus criterios de inclusión de pacientes en el estadio clínico, PSA, el Gleason y el número de cilindros afectados (tabla 5). Sin embargo, hay que reseñar que muchos de los pacientes de estas series se incluyeron de forma retrospectiva, probablemente sin criterios tan estrictos.

En una reciente revisión sobre vigilancia activa, **hasta un 33% de los pacientes que comenzaron VA precisaron de algún otro tratamiento posteriormente** tras una mediana de 2.5 años de seguimiento estrecho (27). Sin embargo, no en todos los casos la indicación de tratamiento se produce por una progresión de la enfermedad. Éste es otro punto controvertido de esta estrategia, y es que, el conocimiento por parte del paciente de tener una enfermedad neoplásica sobre la que no se está actuando, puede llevar a una situación de ansiedad y demanda de tratamiento al poco tiempo de seguimiento, sin que exista evidencia de progresión.

Uno de los estudios más importantes en VA es el de la Universidad de Toronto (21). Conviene conocer los detalles del estudio pues se trata del estudio prospectivo con el mayor seguimiento a largo plazo de todos los estudios realizados sobre VA. Realizado sobre 993

pacientes sometidos a vigilancia activa, se inició en 1995 e incluye a pacientes con cáncer de próstata de bajo riesgo (Gleason ≤ 6 , PSA ≤ 10 ng/ml) o riesgo intermedio favorable (Gleason 3 + 4, PSA 10–20 ng/ml). Los pacientes se sometían a un control periódico del PSA y biopsias de próstata y se ofrecía tratamiento en caso de PSA-DT < 3 años, progresión del Gleason o progresión clínica evidente. Desde el inicio del estudio en 1995 han muerto 149 pacientes y 819 han sobrevivido y siguen el protocolo, con un seguimiento medio desde la primera biopsia de 6.4 años (rango de 0.2 a 19.8 años). De las muertes recogidas, 15 (10%) fueron por cáncer de próstata, todas ellas por enfermedad metastásica. En otros 13 casos se encontraron metástasis, sin embargo 4 de ellos murieron por otras causas y el resto estaban aún vivos. La hazard ratio acumulada de mortalidad por otras causas sobre la mortalidad por cáncer de próstata fue de 9.2:1.0. Un total de 267 pacientes (26.8% del total) recibieron algún tipo de tratamiento adicional en algún momento del seguimiento debido a progresión de la enfermedad. La tasa de pacientes sin tratamiento alguno (supervivencia libre de tratamiento), solamente en vigilancia activa fue de 75.7%, 63.5% y 55% a los 5, 10 y 15 años respectivamente.

Centro	Edad	Seguimiento (años)	Pacientes tratados (%)	Causa del tratamiento	Muerte CaP-específica	Muerte por otras causas
Johns Hopkins (20)	66	2.7	33	Gleason	0%	2%
University Toronto (21)	70.3	6.8	30	PSA	1%	21.4%
UCSF (22)	61.9	3.9	30	Gleason	0%	3%
ERSPC (23)	66	3.9	32	Desconocido	0.2%	11.2%
Royal Marsden Hospital (24)	67	1.8	20	PSA	0%	2%
MSKCC (25)	62	1.8	11	Gleason	Desconocida	Desconocida
University Miami (26)	64	2.9	25	Gleason	0%	2%

Tabla 6. Principales estudios sobre Vigilancia Activa, comparando sus datos respecto a tasa de tratamiento y causa del mismo, muertes cáncer específicas y muertes por otras causas.

Repetición de la biopsia en VA:

La repetición de la biopsia de próstata durante la VA está incorporada en la mayoría de los protocolos y la progresión del Gleason es uno de los indicadores principales de tratamiento a lo largo de la VA. Es importante saber que el **riesgo de infragradaación del Gleason** en una biopsia de próstata de 12 cilindros es de un **20-30%** (28). Ésta es la razón de ser del seguimiento activo, pues puede tratarse de pacientes de alto riesgo que pasan inadvertidos en la biopsia y probablemente se beneficien de un temprano tratamiento primario agresivo.

No se sabe si los cambios en el Gleason que se describen en las biopsias de confirmación y/o seguimiento corresponden a una verdadera progresión o a un infradiagnóstico previo. Probablemente sea debido a una mezcla de ambas circunstancias. En cualquier caso, la repetición de la biopsia sirve para detectarlo y da margen para tomar una actitud adecuada con el paciente. Por ello la programación de biopsias, con un mínimo de 12 cilindros y dirigidas a los aspectos laterales de la próstata, constituye una adecuada estrategia para los protocolos de VA. Según los datos existentes, hasta un 33% de los pacientes dejan de ser candidatos a VA con los resultados de la segunda biopsia de confirmación y precisan de la administración de un tratamiento.

Papel del PSA en VA:

El verdadero valor de la cinética del PSA como factor predictivo de progresión a lo largo del seguimiento es todavía desconocido. El hecho de monitorizar el PSA en los pacientes sometidos a VA tiene su justificación tanto en la sencillez de la prueba como en la evidencia demostrada de la correlación existente entre velocidad de PSA elevada en el año previo al diagnóstico y mortalidad por cáncer de próstata tras tratamiento (29).

Respecto al *PSA double-time* (PSA DT), éste no se ha empleado de forma sistemática en todas las series de VA. Además se ha de recordar que la forma de calcular el PSA DT es muy variable. Algunos grupos, como el canadiense, si lo han tenido en cuenta,

y lo calcularon utilizando un modelo linear mixto que considera al menos 8 determinaciones de PSA.

Aunque de una forma algo arbitraria, la mayoría de las series describen que la determinación de PSA debe realizarse **cada 3 meses** aproximadamente. Al analizar la literatura sobre cinética del PSA como factor indicador de biopsia de seguimiento, se observa una gran variabilidad entre los distintos estudios. Además, conviene apuntar que la indicación de biopsia por elevación del PSA constituye un sesgo en sí misma a la hora de interpretar los datos. Esta forma de indicación de biopsia, según PSA, puede llevar a que los pacientes con elevaciones progresivas del PSA se sometan a biopsias más frecuentemente que los pacientes con una cinética más lenta o larvada, sin que ello asegure que éstos últimos no estén progresando.

En la práctica, el mero hallazgo de cambios en el PSA no justifica la realización de un tratamiento, pero sí debería constituir un factor de alarma para la realización de una nueva biopsia de seguimiento. No obstante, en caso de ausencia de progresión del Gleason y persistencia progresiva de la elevación del PSA se debe valorar una acción terapéutica.

Papel de las pruebas de imagen en VA:

La ausencia de técnicas de imagen adecuadas para el diagnóstico del cáncer de próstata en estadio temprano localizado resulta un asunto de crucial importancia en la VA. La mayoría de pacientes con cáncer de próstata localizado tienen una ecografía normal, y la ecografía transrectal periódica, hasta la fecha, no ha demostrado tener un beneficio en la caracterización tumoral o la detección de progresión durante el seguimiento de estos pacientes.

La **resonancia magnética nuclear** (RMN) constituye una prueba de imagen con resultados prometedores en la VA. Múltiples estudios están evaluando las ventajas de esta técnica sobre la ecografía o el TAC, ya que la RMN permite un mayor realce de la anatomía pélvica y ofrece, además, la posibilidad de una valoración funcional de las lesiones. En la VA, la RMN podría ser utilizada a modo de screening de los pacientes

candidatos a esta modalidad de tratamiento. En este sentido, varios estudios han observado que en los pacientes con extensión extracapsular visible en RMN aumenta la probabilidad de encontrar una progresión en la biopsia control con respecto a los pacientes que tenían una RMN normal. En el estudio de *Dall'Era et al.* se realizó RMN espectroscópica al momento del diagnóstico en 114 pacientes de la serie de VA del UCSF (22). El 75% de los pacientes tenían lesiones sospechosas, o bien, actividad metabólica sugerente de enfermedad tumoral. Cuando se compararon las lesiones anatómicamente visibles con las lesiones visualizadas solamente mediante espectroscopia funcional, se observó que las lesiones anatómicas se asociaron a progresión en la biopsia y a necesidad de tratamiento posterior.

Conclusiones de la VA:

A la espera de resultados más a largo plazo de series prospectivas, los datos actuales de VA muestran que la mortalidad cáncer específica es muy baja aunque la tasa de reintervención durante el seguimiento es moderada (hasta 33%), en parte debido a la ausencia de biomarcadores de riesgo específicos.

Una biopsia de confirmación durante el primer año de seguimiento es crucial para disminuir el riesgo de infragradaación.

La incorporación de **biomarcadores de riesgo individualizado**, junto con el desarrollo de la RMN, puede favorecer el empleo de esta modalidad y disminuir los riesgos para el paciente.

✓ *Terapia focal*

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, hasta el 33% de los pacientes en vigilancia activa (VA) se someterán a un tratamiento definitivo en los primeros 2-5 años de seguimiento, debido a la infragración inicial de la enfermedad. Además, otra potencial desventaja de la VA, criticada por algunos autores, es la limitación mental y emocional que supone la ansiedad asociada al no tratamiento de una enfermedad neoplásica. Por ello, la VA es una opción solo para un subtipo determinado de pacientes, aún por definir de forma más estricta según avance la evidencia.

En este contexto, y con el objetivo de curar y controlar el cáncer de próstata localizado, hace su aparición el concepto de terapia focal. Ésta se encuentra a mitad de camino entre la VA y el tratamiento radical, ofreciendo un control del cáncer con intención curativa con mucha menos morbilidad asociada. Aunque este planteamiento es relativamente nuevo para la próstata, ya se había empleado con éxito en riñón, hígado, mama y cerebro entre otros.

La relevancia actual de la terapia focal en el cáncer de próstata está justificada de acuerdo a una base conceptual previamente establecida. En primer lugar, existe evidencia bastante firme de que la gran mayoría de las metástasis tienen su origen en el mismo clon celular del cáncer de próstata, derivado de la misma lesión, la cual se denomina lesión “índice” (*index lesion*) (30). Además, las características histopatológicas de esta lesión índice pueden predecir el comportamiento clínico de toda la glándula prostática incluso en presencia de múltiples focos tumorales sincrónicos, en más del 90% de los pacientes. Por otro lado, aunque el cáncer de próstata es típicamente multifocal y goza de una **heterogeneidad clonal** dentro de la propia glándula, no todos esos focos tumorales van a tener un potencial letal. Además, respecto a esas lesiones tumorales sincrónicas (lesiones no índice), se ha observado que en más del 80% de los pacientes con una lesión índice tumoral clara, el volumen agregado de lesiones secundarios era muy pequeño (< 0.5cc).

Por todo ello, la correcta valoración de la **significación clínica** y pronóstica del cáncer de próstata es de crucial importancia. Así, de forma clásica, el umbral para definir enfermedad clínicamente significativa capaz de metastatizar se fijó en lesiones de 0.5 cc de volumen con un Gleason mínimo de 4 en un paciente con una expectativa de vida mayor de 10 años (31).

Ya que la mayoría de tumores metastásicos se origina de un único clon celular, parece sensato y eficaz identificar y tratar focalmente estas lesiones potencialmente letales. Por tanto, el tratamiento selectivo de la enfermedad clínicamente significativa, aceptando la posibilidad de dejar enfermedad residual no significativa, parece razonable.

Hasta la fecha existe una experiencia muy limitada en cuanto a los resultados de la terapia focal. En este apartado repasaremos el papel actual de la biopsia de fusión dirigida con RMN como método diagnóstico y herramienta de desarrollo de esta modalidad terapéutica, así como las distintas posibilidades de terapia focal en cáncer de próstata (crioterapia, HIFU y nuevas alternativas).

Biopsia de fusión (ECO-RMN):

El desarrollo de la **RMN multiparamétrica** (RMN-MP) ha supuesto una importante innovación tecnológica para el avance de la terapia focal del cáncer de próstata. Una RMN-MP estándar incluye secuencias T1 con secuencias realizadas con contraste dinámico (*dynamic contrast enhancement o DCE*), secuencias T2 y secuencias de difusión (*diffusion weighted imaging DWI*).

Actualmente la RMN-MP es la mejor técnica no invasiva para visualizar lesiones tumorales prostáticas. Aunque la RMN-MP no sea capaz de detectar la totalidad de los focos tumorales si parece **detectar de forma efectiva los focos clínicamente significativos**, según los datos del Gleason y el volumen tumoral. Para estas lesiones significativas, las sensibilidad y especificidad de la RMN-MP llega al 90%. En una serie de 83 pacientes estudiados mediante RMN-MP (T2 + DCE + DWI) antes de la biopsia, la

RMN se asoció a una sensibilidad, especificidad y precisión para la detección del cáncer de próstata del 95%, 74%, y 86%, respectivamente (32). Adicionalmente, el empleo de la tecnología 3D con la RMN-MP puede facilitar localizar los focos tumorales dentro de la glándula prostática y ser utilizada para dirigir una acción diagnóstica o terapéutica.

Recientemente desarrollada, la **tecnología de fusión** de RMN y ecografía (*MRI-ultrasound fusion technology*) permite realizar biopsias dirigidas a áreas sospechosas detectadas en la RMN-MP. El sistema consiste en un rastreador espacial que permite localizar la posición de los cilindros a biopsiar sobre una reconstrucción en 3D de la próstata; luego, el software del sistema permite fusionar las imágenes de la RMN con las de la ecografía a tiempo real facilitando la biopsia de las áreas sospechosas. Las series más actuales sugieren que solo el 63% de los pacientes con elevación del PSA tendrán una lesión o área sospechosa en la RMN-MP. Posteriormente, la biopsia dirigida de estas áreas será diagnóstica en aproximadamente el 65% de los casos (33).

Aunque la tasa de detección de cáncer mediante biopsias dirigidas es menor que mediante biopsias sistemáticas, la mayoría de los tumores que no se diagnostican en las biopsias dirigidas son tumores **no significativos**, probablemente no letales, según los métodos actuales de clasificación. La tasa de detección de cáncer clínicamente significativo mediante biopsia de fusión es del **42%** (33).

En un interesante estudio realizado recientemente en pacientes con biopsia de próstata previa negativa o sometidos a protocolo de VA, la adición de la biopsia de fusión a las biopsias sistemáticas aumentó la tasa de diagnóstico de todos los cánceres de próstata. El 38% de los pacientes solo fueron diagnosticados mediante biopsia de fusión (34).

Como muestran todos estos estudios, la RMN-MP y la posibilidad de fusión con la ecografía han llegado para quedarse en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata localizado. Por ello, un conocimiento actualizado por parte del urólogo se hace necesario para el óptimo manejo de estos pacientes.

Crioterapia

El primer estudio que dio a conocer la **crioterapia focal** fue el publicado por Onik et al. en 2002 (35). En dicho estudio se valoraron 9 pacientes, con cáncer de próstata unilateral en la biopsia, y sometidos a crioablación con preservación del haz neurovascular contralateral. A los 3 años de seguimiento medio, el PSA se mantuvo estable en todos los pacientes; y en 6 pacientes en los que se realizó biopsia control, ésta fue negativa. Además, 7 de los 9 pacientes mantuvieron la función eréctil inalterada.

Tras esta primera experiencia se han sucedido los estudios sobre esta modalidad terapéutica. En la mayoría de los estudios, la técnica consiste en una **hemicrioablación** completa del lóbulo de la próstata afectado. No obstante, los esfuerzos actuales se centran en la optimización de la colocación de la sonda criogenizadora para destruir únicamente el tejido diana y preservar el tejido sano.

La definición de **recurrencia** tras crioterapia no está aún consensuada. Además, resulta difícil asegurar si estos pacientes sufren una verdadera recurrencia de la enfermedad tratada o si se trata de la progresión de lesiones que pasaron inadvertidas en el momento del diagnóstico. Los datos actuales hablan de una tasa recurrencia bioquímica que varía desde el **7% hasta el 27%** (normalmente definida como una elevación del PSA $>50\%$ del nadir o nadir +2), observándose una confirmación histológica mediante biopsia en el 4-47% de estos pacientes. De forma interesante, la mayoría de estas recurrencias (70–93%) ocurrían en el lado contralateral al de la crioablación, por lo que es probable que se deban a fallos en el diagnóstico inicial más que a fallos del tratamiento.

La mayor experiencia y los resultados más amplios publicados sobre crioterapia focal proceden del **registro COLD** (*Cryo On-Line Data*). En su última actualización, de los 1160 pacientes tratados mediante crioterapia focal, la supervivencia libre de recidiva bioquímica (definida según la ASTRO como 3 aumentos consecutivos del PSA sobre el nadir postratamiento) a los 3 años, fue del 75.7% (36). Además, se ha observado que los resultados oncológicos de la crioterapia focal son superponibles a los resultados de la

crioterapia completa de toda la próstata. Es por ello que su uso ha aumentado de forma exponencial en los últimos años.

Respecto a los efectos secundarios, según los datos del registro COLD, la continencia urinaria tras la crioterapia focal ronda el 98% y el mantenimiento de la función eréctil el 58%. Se observó retención de orina (>30 días) en un 1.1% de los pacientes y hay un solo caso (0.1%) de fistula rectouretral.

HIFU (*high-intensity focused ultrasound*)

El funcionamiento del HIFU se basa en el mismo principio que los ultrasonidos convencionales, pero en este caso la fuente de emisión de los ultrasonidos tiene la energía suficiente para, al ser aplicada sobre un pequeño foco, aumentar la temperatura de éste hasta los 80-90°C en 2-3 segundos, lo cual destruye cualquier tejido. Esta destrucción tisular se debe a 3 fenómenos: **coagulación, cavitación y calor**. El aumento brusco de la temperatura en el foco (entre 85-100°C) produce necrosis por coagulación. Cada disparo dura 5 segundos con un tiempo de 5 segundos entre cada disparo. El fenómeno de cavitación resulta por la vibración de burbujas microscópicas de vapor de agua producidas en el tejido con los sucesivos impulsos de ultrasonidos. Finalmente, la sumatoria de todos los disparos en el tiempo produce un aumento gradual de la temperatura dentro del órgano.

Hasta el momento existen dos aparatos para realizar HIFU, el Ablatherm® fabricado en Francia y el Sonoblate® fabricado en USA. Ablatherm® tiene como ventajas sobre Sonoblate® el que permite adaptar la longitud de la lesión, tener el control en tiempo real de la pared rectal, tiene múltiples circuitos de seguridad para evitar focalización accidental de la pared rectal, un detector de movimiento que interrumpe el tratamiento si el paciente se mueve y una sonda ecográfica para visualizar la próstata de 7,5 MHz y una de 3 MHz para realizar el tratamiento integradas en el mismo dispositivo. Las aplicaciones de Sonoblate® son más limitadas ya que permite tratar solamente casos de cáncer de próstata iniciales. Por el contrario Ablatherm® permite tratar casos que han fracasado al tratamiento con radioterapia externa o realizar HIFU paliativa. Sonoblate® se realiza solamente con

anestesia general y el paciente en posición dorsal mientras que Ablatherm® se puede realizar con anestesia raquídea y el paciente en posición lateral.

El primer estudio con resultados favorables para la terapia focal de alta intensidad guiada por ecografía (*high-intensity focused ultrasound o HIFU*) fue publicado en 1995 (37). Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados han investigado la efectividad de la HIFU como tratamiento sobre la totalidad de la glándula prostática, más que como una terapia realmente focalizada.

Una de las mayores series de HIFU sobre la totalidad de la próstata es la de *Ganzer et al.* (38). Con 14 años de seguimiento sobre 538 pacientes obtienen una supervivencia libre de recurrencia bioquímica a los 5 y 10 años del 81% y 61%, respectivamente. El porcentaje de pacientes con enfermedad metastásica fue de 0.4%, 6% y 15.4% según fueran pacientes de bajo, intermedio o alto riesgo al diagnóstico. La tasa de mortalidad cáncer específica fue de 3.3%. Los principales efectos adversos de la HIFU sobre toda la próstata son la disfunción eréctil (44%), incontinencia urinaria (8%), retención urinaria (5.3%), dolor perineal crónico (3.4%) y fistula rectoureteral (1%).

Como hemos señalado anteriormente, hasta la fecha, pocos estudios han evaluado la HIFU como terapia focalizada. Un estudio comparó 70 pacientes sometidos a HIFU completa vs 29 pacientes sometidos a HIFU focal sobre la hemipróstata afecta, observando un 82% de biopsias negativa a los 6 meses (86% para los pacientes con HIFU completa vs 75% para los pacientes con HIFU focal). No se encontraron diferencias significativas en los síntomas urinarios entre ambas técnicas (38). En otro estudio similar se analizaron los resultados de la hemiablación con HIFU sobre 12 pacientes con una mediana de seguimiento de 10 años. La supervivencia libre de progresión fue del 90% y del 38% a los 5 años y 10 años, respectivamente. Cinco pacientes precisaron tratamiento de rescate mediante nueva HIFU o bloqueo hormonal. Las complicaciones más frecuentes fueron la retención aguda (1 paciente) y la infección de orina (2 pacientes).

FLA (Focal Laser Ablation)

Aunque la crioablación y la HIFU son las dos formas de terapia focal en las que se tiene mayor experiencia, existen otras modalidades de terapia focal en fase de investigación que conviene conocer como la **ablación focal por láser (FLA)**.

Esta modalidad utiliza la energía láser para la ablación de lesiones visibles mediante RMN. La ventaja de esta técnica es que se puede realizar a tiempo real guiada por RMN, lo cual permite al cirujano asegurarse el tratamiento completo de las lesiones así como respetar las áreas sanas y minimizar la morbilidad. Se ha realizado un ensayo en fase I sobre 12 pacientes en el que el 50% no mostró evidencia de enfermedad tras el tratamiento. No se encontraron problemas de disfunción eréctil ni síntomas miccionales. Otro estudio reciente evaluó a 9 pacientes sometidos a FLA y la biopsia guiada por RMN de la zona ablacionada no encontró evidencia de tumor en 7 de los pacientes (78%) aunque encontró lesiones Gleason 6 en 2 de ellos (22%).

Conclusiones de la terapia focal:

La **terapia focal** en cáncer de próstata localizado ofrece un panorama muy prometedor con el objetivo de conseguir un control efectivo de la enfermedad minimizando al máximo la morbilidad terapéutica. No obstante, aún son necesarios estudios a largo plazo para validar los resultados de estas técnicas.

No existe aún evidencia suficiente para realizar recomendaciones acerca del uso de estas terapias ablativas en la práctica clínica. Por ello, el futuro acerca de estas modalidades terapéuticas deberían pasar por la realización de ensayos clínicos randomizados, que incluyan **biomarcadores pronósticos individualizados**, para poder establecer la verdadera eficacia de las mismas y que se generen datos estandarizados y comparables.

A1.3.3.- Nuevas herramientas pronósticas

✓ *Test genéticos.*

Actualmente, las decisiones y el manejo clínico del CaP se basan en la conjunción del **PSA**, el **estadio clínico** (tacto rectal) y la **puntuación Gleason** de la biopsia, los cuales combinados en distintos nomogramas expresan las probabilidades del paciente para tener una enfermedad agresiva.

A día de hoy, el único biomarcador molecular aprobado y validado, distinto al PSA, es el *Prostate Cancer Gen 3 (PCA3)* que se emplea para tomar la decisión de realizar una segunda o tercera biopsia, pero no tiene utilidad para tomar decisiones terapéuticas una vez establecido el diagnóstico. Los test genómicos como biomarcadores pronósticos, podrían ser unos buenos candidatos para rellenar ese hueco en el algoritmo de decisiones clínicas.

El estudio genético del paciente forma parte de la medicina personalizada o medicina de precisión. Su aplicación está basada en el **estudio del tejido** prostático (de una biopsia o de una pieza de prostatectomía), al cual se le realiza un análisis del **DNA** genómico (alteraciones estructurales, mutaciones) o epigenético (DNA metilación). También se puede estudiar el **RNA**, y distintas **proteínas** y **metabolitos** celulares.

Actualmente, existen distintos “*kits*” comercializados. Cada vez que se realiza una prueba en un paciente, sus resultados se comparan con las grandes bases de datos que dieron origen a dichos “*kits*”, realizándose análisis estadísticos que nos ayudan a elegir la mejor actitud para el paciente basándonos en probabilidades.

A continuación, explicaremos brevemente la aplicación y evidencia actual de algunos de los test que han ganado más difusión en los últimos años:

a.- Test Prolaris o test de progresión del ciclo celular (*Cell Cycle Progression o CCP*).

Este test genético utiliza como muestra el tejido prostático procedente de una biopsia o una prostatectomía radical. El tejido se puede conservar en formol, fijarse en parafina y posteriormente ser analizado.

El test analiza los **niveles de expresión de 31 genes relacionados con la progresión del ciclo celular (CCP)** (*FOXM1, CDC20, CDKN3, CDC2, KIF11, KIAA0101, NUSAP1, CENPF, ASPM, BUB1B, RRM2, DLGAP5, BIRC5, KIF20A, PLK1, TOP2A, TK1, PBK, ASF1B, C18orf24, RAD54L, PTTG1, CDCA3, MCM10, PRC1, DTL, CEP55, RAD51, CENPM, CDCA8 y ORC6L*).

Este panel de genes ya había mostrado su valor pronóstico en cáncer de mama, pulmón y cerebro. Los estudios de validación de este test en cáncer de próstata, demostraron que es capaz de predecir de forma **independiente el riesgo de muerte por CaP a los 10 años** (39, 40).

Su uso como biomarcador pronóstico tendría dos posibilidades:

- *Test post-biopsia*: con el objetivo de evitar el tratamiento a los pacientes con pocas probabilidades de beneficiarse del mismo (detectar tumores indolentes).
- *Test post-prostatectomía radical*: con el objetivo de detectar tumores de alto riesgo, predecir el riesgo de recidiva bioquímica (BCR) y determinar qué pacientes podrían beneficiarse de tratamientos adyuvantes.

Los resultados del test Prolaris se miden en unidades de -3 a 7. Cada incremento en 1 unidad en el Score Prolaris representa un aumento x2 del riesgo de muerte. Los resultados genéticos del test, junto con el resto de datos clínico-patológicos del paciente, permiten estimar el riesgo de muerte cáncer-específica a los 10 años. Además, compara este riesgo con el riesgo estimado según el nomograma pronóstico de la AUA.

b.- Oncotype DX GPS (*genomic, prostatic score*).

Este test genético también utiliza como fuente de información el tejido prostático procedente de la biopsia diagnóstica de CaP.

Analiza **17 genes** de 4 vías biológicas distintas:

- **Organización celular:** FLNC, GSN, GSTM2, TPM2.
- **Andrógenos:** AZGP1, FAM13C, KLK2, SRD5A2.
- **Proliferación celular:** TPX2.
- **Respuesta estromal:** BGN, COL1A1, SFRP4

Sobre este panel de genes, el test Oncotype DX GPS es capaz de predecir la agresividad del tumor, riesgo de BCR a los 5 años y riesgo de metástasis, aportando información práctica para la toma de decisión en cuanto a inicio de vigilancia activa vs tratamiento radical (cirugía o radioterapia). Fue desarrollado en distintos estudios colaborativos con la Clínica Cleveland y la UCSF (San Francisco) y ha sido validado en dos grandes estudios prospectivos recientes como predictor independiente de anatomía patológica adversa (mayor Gleason y pT3) en la pieza de prostatectomía (41).

Los creadores del test lo indican especialmente en pacientes con Gleason 6 (riesgo bajo) y Gleason 7 con bajo volumen tumoral en la biopsia. Constituye una herramienta más para seleccionar candidatos a vigilancia activa.

Los resultados del Oncotype GPS se informan en una escala que va del 0-100. Cada gen tiene su peso en el algoritmo final. Según los valores en la escala, tendrá mejor o peor pronóstico.

c.- Test Decipher. Genomic Resource Information Database. Grid Decipher.

Si hay un test genómico con potencial de aplicación a la clínica ese es el Decipher. Este test constituye la mayor base de datos genómica en urología.

La muestra de tejido que emplea proviene de la pieza de prostatectomía radical. Analiza **22 genes** involucrados en vías biológicas del cáncer de próstata que están asociados a cáncer de próstata agresivo:

- Subtipos moleculares: ERG, ETV1-5, SPINK1.
- Biomarcadores prostáticos: PCA3, PTEN, SChLAP1, Mki-67, PCAT1, TOP2A.
- Vías biológicas: AR, pérdida de RB, ciclo celular, reparación DNA.
- Vías de respuesta a fármacos: EFGR, IGFR, MET, HER, WNT, PD1/L1.
- Células pequeñas y neuroendocrinos: Cyclin D1/p16, NEAT1, NKX3.1, CHGA, SYP.

Indicado tras la cirugía en pacientes de alto riesgo Gleason > 7, pT3a-b o con márgenes positivos. Constituye un **predictor independiente de metástasis a los 5 y 10 años de la prostatectomía radical**. En caso de recidiva bioquímica (BCR), predice el riesgo de metástasis a los 3 años (42). Tras la prostatectomía radical, Decipher reclasificó al 80% de los pacientes, con respecto a la clasificación de riesgo clínica tradicional de la NCCN. El 60% pasó a un riesgo menor y el 20% pasó a un riesgo mayor.

Identifica a pacientes como alto, medio o bajo riesgo de tener metástasis. Los pacientes con **bajo riesgo genómico Decipher** serían candidatos a actitud conservadora tras la cirugía; y a los pacientes con **alto riesgo genómico Decipher** serían candidatos a radioterapia adyuvante. El 98.5% de los pacientes reclasificados como bajo riesgo por Decipher no desarrollaron metástasis a los 5 años de la cirugía (43).

Conclusiones:

Los test genéticos como biomarcadores pronósticos son capaces de detectar la **heterogeneidad tumoral** e **individualizar** la situación y pronóstico de cada paciente. Por tanto, podrían permitir tomar decisiones más eficientes.

Por el momento son test bastante caros (alrededor de 3.000 euros) y por tanto de difícil acceso en la práctica diaria pues resulta difícil demostrar su eficiencia y coste/beneficio. Según la AMHealth Drug Benefits 2014 se ahorrarían 588 dólares por paciente, usando un test molecular, frente a la realización de rebiopsia prostática.

El futuro de este prometedor escenario de los biomarcadores genómicos pasa por la realización de grandes estudios prospectivos multicéntricos que validen su verdadero papel pronóstico.

Test / precio	Muestra	Resultado	Compañía
Prolaris 3400 \$	Biopsia o PR	CCP score de -3 a 7. Riesgo de muerte CaP-específica o BCR a los 10 años	Myriad Genetics
Oncotype DX GPS 4180 \$	Biopsia	GPS de 0-100. Probabilidad de tener más alto Gleason score y/o pT3 en PR	Genomic Health Inc.
Decipher 4250 \$	PR	Riesgo de metástasis a los 5 años post PR y 3 años post RB	GenomaDX Biosciences

Tabla 7. Resumen de los principales test genómicos disponibles actualmente. Adaptado de: *Gómez Rodríguez A, Loiziaga Iriarte A, Bachiller Burgos J, Borque Fernandez A. Herramientas para el manejo del cáncer de próstata. En: Actualización en Cáncer de próstata. Desde el diagnóstico a la resitencia a la castración. Ed. IMC. Madrid 2016.*

✓ *Nomogramas y modelos predictivos.*

En el momento actual, el manejo y toma de decisiones clínicas en los pacientes con CaP se apoya sobre modelos predictivos clínicos, basados en la **observación previa de la evolución de grandes series de pacientes**. En este apartado abordaremos el estado actual de estos modelos y sus perspectivas de futuro.

Cualquier modelo predictivo se sustenta en la existencia de una serie de parámetros o variables que constituyan factores de riesgo o protección para la enfermedad. Este concepto nos lleva, en primer lugar, a una clasificación sencilla de los sujetos en **grupos de riesgo**.

Clasicamente, los grupos de riesgo en CaP se han establecido fundamentalmente en base a tres parámetros de uso rutinario: **PSA, estadio clínico y puntuación de Gleason**. Mediante la combinación de estas tres variables se han creado distintas clasificaciones y modelos ampliamente conocidos por los urólogos.

Las siguientes tablas reflejan las clasificaciones de riesgo más conocidas y empleadas en la actualidad:

- Grupos de riesgo de D'Amico
- Grupos de riesgo de la National Cancer Comprehensive Network (NCCN)
- Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología (EAU)

Grupos de riesgo de D'Amico	
Bajo riesgo	cT1c-cT2a y Gleason < 7 y PSA ≤ 10 ng/ml
Riesgo intermedio	cT2b o Gleason 7 o PSA > 10 y ≤ 20 ng/ml
Alto riesgo	cT2c o Gleason > 7 o PSA > 20 ng/ml

Grupos de riesgo de la NCCN 2015	
Muy bajo riesgo (localizado)	cT1c y Gleason <7 y PSA<10 y <3 cilindros de biopsia (+) con ≤ 50% afectado en cada uno y PSAD < 0,15 ng/ml
Bajo riesgo (clínicamente localizado)	cT1-cT2a y Gleason < 7 y PSA < 10 ng/ml
Riesgo intermedio (clínicamente localizado)	cT2b-cT2c o Gleason 7 o PSA 10-20 ng/ml
Alto riesgo (clínicamente localizado)	cT3a o Gleason >7 o PSA > 20 ng/ml
Muy alto riesgo (localmente avanzado)	cT3b-cT4 o Gleason primario 5 o > 4 cilindros de biopsia Gleason > 7, o bien 2 o los 3 parámetros del riesgo intermedio en un mismo paciente.
Metastásico	Cualquier T, N1 Cualquier T, cualquier N, M1

Grupos de riesgo de la EAU 2017	
Bajo riesgo (clínicamente localizado)	cT1-cT2a y Gleason < 7 y PSA > 10 ng/ml
Riesgo intermedio (clínicamente localizado)	cT2b o Gleason 7 o PSA 10-20 ng/ml
Alto riesgo	Clínicamente localizado: cT2c o Gleason >7 o PSA >20 ng/ml // Localmente avanzado: cT3-4, cualquier Gleason, cualquier PSA.

Estas tres clasificaciones en grupos de riesgo clínicos gozan de una amplia aceptación y difusión debido a que son sencillas e intuitivas y por ello son fácilmente aplicables en la rutina clínica. Sin embargo, su elaboración no ha sido científicamente rigurosa y las variables seleccionadas lo fueron por motivos intuitivos, consensuados, y no basados en una elección metodológica y ponderada. De esta manera cada grupo de riesgo resulta ser, en realidad, clínicamente **heterogéneo** y engloba en un mismo grupo a pacientes con evoluciones y resultados oncológicos muy distintos.

Las clasificaciones por grupos de riesgo, por tanto, **no son útiles para responder a la demanda actual de individualización y personalización del riesgo en cada paciente**. Para ello, a día de hoy, nos servimos de modelos predictivos multivariantes o nomogramas.

Un **nomograma**, en su concepción más general y matemática, representa simultáneamente el conjunto de las ecuaciones que definen un determinado problema (en nuestro caso, la enfermedad) y el rango total de sus soluciones (evolución de dicha enfermedad). Los nomogramas en el cáncer de próstata no son más que **modelos multivariante** que analizan la asociación entre una serie de variables independientes predictoras (p.e: PSA, puntuación Gleason, estadio clínico o cilindros afectados) y las variables dependientes, resultado (p.e.: márgenes positivos en el tejido, supervivencia libre de progresión, desarrollo de metástasis).

- **Validación de un nomograma:**

Para evaluar y validar la calidad de un nomograma clínico es preciso analizar tres conceptos clave: calibración, discriminación y utilidad clínica (14).

Calibración:

Responde a la cuestión de si las predicciones del modelo se corresponden con la realidad del medio en el que se va a aplicar. **¿Las predicciones que arroja el modelo para los diferentes hipotéticos pacientes se corresponden con lo que pasa en mi medio?**

Se representa gráficamente mediante una curva de calibración, en la que en el eje de abscisas representa una escala graduada del 0 a 100% de probabilidad, correspondiente a la diferentes probabilidades predichas por el modelo; y en el eje de ordenadas, representa una nueva escala graduada del 0 a 100% de incidencia, correspondiente a las diferentes incidencias de aparición del evento en nuestro medio habitual. A continuación ubicamos a nuestro pacientes en el gráfico según la probabilidad asignada por el modelo (p.e 20% de probabilidad para tener CaP según nuestro modelo, en el eje de abscisas) y según la frecuencia de aparición del evento en nuestro medio (de forma ideal esta probabilidad debería acercarse mucho al 20%, en el eje de ordenadas). Tras ello, se unen todos los puntos y se obtiene la curva de calibración para ese modelo en nuestro medio.

En una calibración perfecta en la que ambas probabilidades coincidan, la línea generada debería ser una bisectriz del eje de coordenadas. Si la línea transcurre por debajo de dicha bisectriz significa que el modelo sobreestima la realidad, asigna probabilidades más altas de lo que realmente ocurre; y a la inversa, si la línea transcurre por encima de la bisectriz, el modelo estará infraestimando la realidad.

Discriminación:

Es la capacidad del modelo de **asignar el verdadero riesgo de presentar el evento a los pacientes en los que va a ocurrir dicho evento, y el verdadero riesgo de que no ocurra a los pacientes en los que no va a ocurrir.**

Este análisis se realiza mediante las Curvas de Rendimiento Diagnóstico o **Curvas ROC** (*Receiver Operating Characteristics*), que se construyen a partir de los diferentes valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para cada uno de los diferentes puntos de corte de probabilidad del modelo.

Una vez representadas estas curvas ROC, se calcula el área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*). Un AUC de 0,50 (50%) equivale a una capacidad de discriminación nula ya que existe la misma probabilidad de que ocurra que de que no ocurra el evento. Por consenso, cuando el AUC es de 0,70 (70%) se considera como aceptable capacidad de discriminación; es buena si es del 0,80 (80%); y perfecta cuando llega al 1,0 (100%) (figura 1).

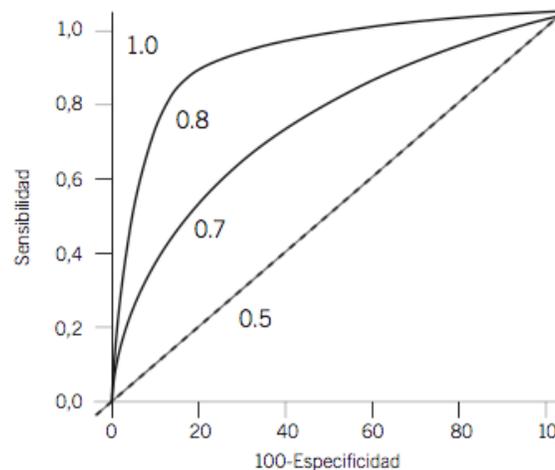


Figura 1. Ejemplificación sobre el plano de distintas curvas ROC y sus respectivas Áreas Bajo de Curva (AUC).

Utilidad clínica:

Una vez hemos construido un modelo que ha demostrado estar bien calibrado y tener una adecuada capacidad discriminatoria, hemos de demostrar que el modelo tiene una utilidad clínica.

La utilidad clínica es la capacidad del modelo para convertirse en una herramienta que permita tomar decisiones clínicas en la práctica médica habitual. Es el fin para el cual ha sido creado el modelo y por tanto su característica más relevante. Se trata de saber cómo tomar las decisiones clínicas con las predicciones establecidas en el modelo. Por ejemplo, saber valorar por encima de qué probabilidad (**punto de corte**) del evento deberíamos considerar que el paciente precisa una intervención.

Establecer puntos de corte es quizás la forma más eficiente de dotar al modelo de una utilidad clínica, pues permite la toma de decisiones sobre los pacientes de forma sencilla. Sin embargo, no siempre se establecen puntos de corte en los distintos modelos existentes para el cáncer de próstata, lo cual limita enormemente su implementación clínica.

El análisis matemático y estadístico que se suele utilizar para definir estos puntos de corte es el **análisis de la curva de decisión**. Este análisis permite visualizar de un modo gráfico el beneficio clínico neto obtenido al escoger un determinado punto de corte de la predicción. El beneficio clínico neto se expresa como la relación de verdaderos positivos y falsos positivos para cada punto de corte. De este modo, cuando la línea correspondiente al modelo se aleja de la correspondiente a considerar a todos los casos como negativos, y sobre todo como positivos, los puntos de corte empiezan a ofrecer un beneficio clínico neto.

Sin embargo, este método no es fácilmente aplicable en la clínica. Existen otros métodos y representaciones que resultan mucho más intuitivas y útiles para identificar puntos de corte:

- **Diagramas de cajas:** una caja representa la distribución de probabilidades asignada por el modelo a los pacientes afectos del evento y otra caja representa la

distribución de probabilidades asignadas por el modelo a los pacientes sin el evento. Cuanto más separadas estén las cajas entre sí, más fácil es identificar un valor entre ellas por encima del cual se sitúen los pacientes con evento y por debajo los pacientes sin evento (figura 2).

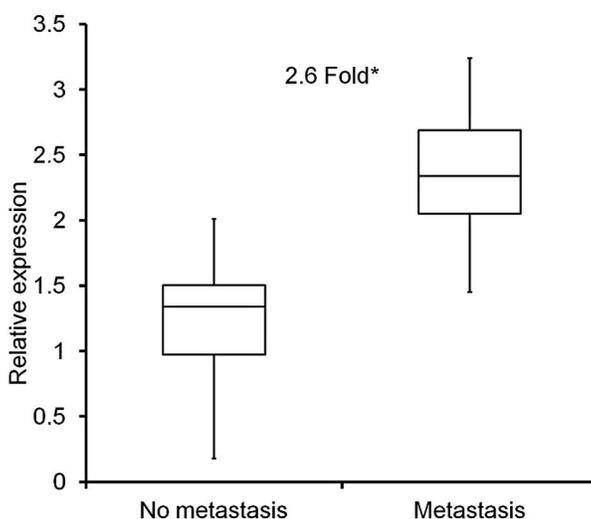


Figura 2. En este ejemplo de diagrama de cajas se representa la probabilidad de metastásis cuando se expresa un determinado marcador. Se observa como se podría establecer un punto de corte imaginario aproximadamente a la altura del 2, por encima del cual estarían la mayoría de pacientes que desarrollan metástasis, y por debajo del cual estarían la mayoría de pacientes que no desarrollan metástasis.

- **Funciones de densidad de probabilidad (FDP):** son otra forma de representación gráfica en la que se construyen dos curvas, una para los eventos y otra para la ausencia de eventos. En el eje de abscisas se representan las probabilidades de evento determinadas por el modelo, y en el de ordenadas la densidad de eventos para cada punto de corte de probabilidad.

La situación ideal representaría a un área espiculada en el rango de probabilidades altas de ocurrir el evento que recogiese los eventos reales de acuerdo a las altas probabilidades de evento asignadas por el modelo, y un área espiculada ubicada en las probabilidades bajas de evento que recogiera los no eventos de acuerdo a sus bajas probabilidades de evento asignadas por el modelo. Entre ambas se situaría una zona de

valle. Cuanto más espigadas y separadas son las áreas mayor es la capacidad discriminadora del modelo y intuitivo resulta escoger el punto de corte óptimo, el cual se debe situar en la zona de valle entre ambas áreas.

- **Curvas de utilidad clínica (CUC).** Probablemente, la forma más útil y práctica para identificar puntos de corte en modelos predictivos. En ellas, se traza en el eje de abscisas una escala graduada del 0 al 100% que corresponde a los diferentes puntos de corte de probabilidad asignada por el modelo al evento a estudio; y en el eje de ordenadas otra escala graduada del 0 al 100% que corresponde a un porcentaje, que se lee en función de la curva que se analice:

a) la curva que nos indica el porcentaje de pérdidas de diagnóstico del evento de interés según el punto de corte escogido en el eje X, y a partir de ahí en el lugar en que corta la curva trasladarlo al eje Y y conocer dicho porcentaje de pérdidas.

b) la curva que nos indica el ahorro en pruebas diagnósticas o tratamientos al proyectar el punto de corte a dicha curva y desde allí observar su proyección en el eje Y.

Las CUC son la herramienta más clarificadora en la elección de puntos de corte de utilidad clínica, pues muestran tanto el riesgo de pérdidas de diagnóstico/tratamiento no deseadas al elegir un punto de corte, como el ahorro en diagnósticos/tratamientos al aplicar dicho punto de corte.

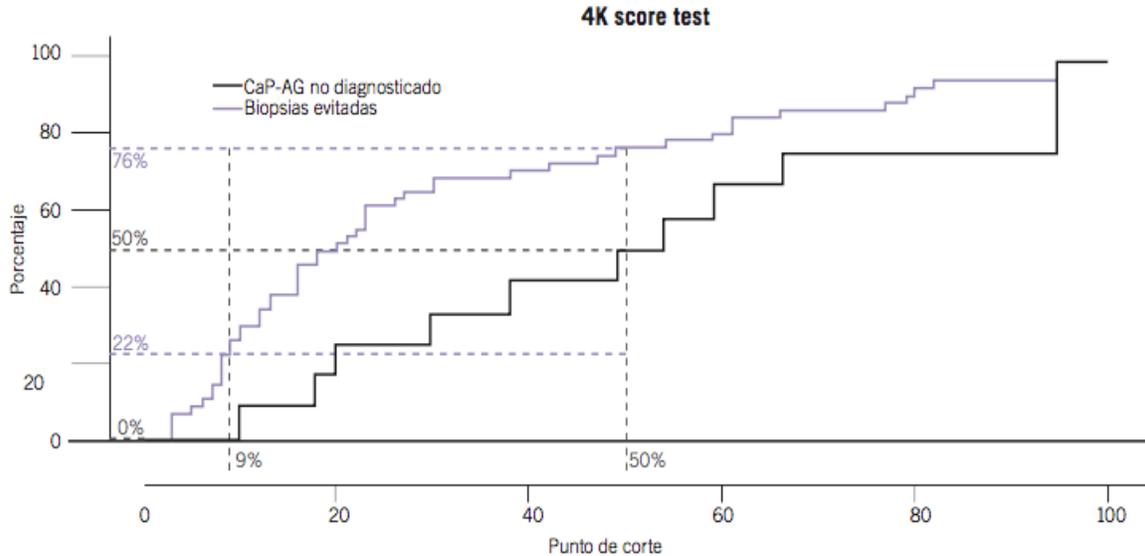


Figura 3. Curva de utilidad clínica (CUC) para la estimación de CaP de Alto Grado mediante 4Kscore Test, en una serie de 51 pacientes biopsiados en el Hospital Universitario Miguel Servet. En la línea de abscisas se ubican los diferentes puntos de corte de decisión clínica que coinciden con la predicción del test; al trazar una línea perpendicular sobre un determinado valor del punto de corte, ésta corta a la línea negra (CaP-AG no diagnosticado) y al trazar una línea horizontal a nivel de ese punto se obtiene el porcentaje de pacientes de CaP-AG no diagnosticado para ese punto de corte. La misma línea perpendicular anterior corta a la línea violeta en un punto (biopsias evitadas) y su traslación al eje de ordenadas nos indica el número de biopsias evitadas para un determinado punto de corte. Adaptado de: “Herramientas para el manejo del cáncer de próstata” de Gómez Rodríguez A, Loiziaga Iriarte A, Bachiller Burgos J y Borque Fernandez A, perteneciente al libro “Actualización en Cáncer de próstata. Desde el diagnóstico a la resitencia a la castración” (Ed. IMC. Madrid 2016).

Por último, todo modelo debe someterse a una validación interna y una validación externa:

Validación interna: consiste en testar las capacidades del modelo sobre las propia serie sobre las que se ha generado, mediante los parámetros arriba mencionados (calibración, discriminación y utilidad clínica). La validación interna suele arrojar resultados favorables al provenir de las propias series sobre las que se han creado los modelos, hasta el punto de que en determinados casos se corre el riesgo de obtener modelos sobreajustados para las series sobre las que han sido generados, resultando difícilmente aplicables a otras series diferentes.

Validación externa: consiste en testar el modelo, con los mismos métodos, sobre una o más series diferentes a las utilizadas para su génesis. Cuantas más validaciones externas, más fiables serán sus resultados. SI en este análisis el modelo presenta resultados favorables significa que éste es fiable e implementable en diferentes entornos.

- **Modelos predictivos actuales en cáncer de próstata**

La cantidad y diversidad de modelos predictivos existentes actualmente, requeriría de una enorme extensión de papel y literatura para nombrarlos y explicarlos en su totalidad. Dado que este no es el objetivo de esta trabajo de tesis, en este punto se pretende únicamente realizar una síntesis de los modelos actuales más significativos en el escenario clínico actual.

Es preciso señalar que esta síntesis está basada en el genial capítulo “*Herramientas para el manejo del cáncer de próstata*” de Gómez Rodríguez A, Loiziaga Iriarte A, Bachiller Burgos J y Borque Fernandez A, perteneciente al libro “*Actualización en Cáncer de próstata. Desde el diagnóstico a la resitencia a la castración*” (Ed. IMC. Madrid 2016).

Podemos dividir a los modelos existentes, según el momento de su predicción clínica, en:

- a.- Modelos predictivos para diagnóstico de cáncer en la biopsia.

- b.- Modelos predictivos tras prostatectomía radical.

- c.- Modelos predictivos tras rescate al tratamiento con intención curativa y tras tratamiento sistémico al cáncer de próstata diseminado.

a.- Modelos predictivos para diagnóstico de cáncer en la biopsia. Comparativa de variables que tienen en cuenta.

	PSA	Edad	Tacto rectal	PSA libre	Ecografía	Raza	Antecedentes	Biopsia previa	PSAv	Cilindros	IPSS	Vasectomía	CPK	PAP
Optenberg, <i>et al.</i> ⁴⁴	x	x	x			x								
Bababian <i>et al.</i> ⁴⁵	x	x											x	x
Eastham <i>et al.</i> ⁴⁶	x	x	x			x								
Garzotto <i>et al.</i> ⁴⁷	x	x	x		x	x	x				x	x		
Karakiewicz <i>et al.</i> ⁴⁸	x	x	x	x										
Suzuki <i>et al.</i> ⁴⁹	x	x	x	x	x									
Thompson <i>et al.</i> ⁵⁰	x	x	x			x	x	x	x					
Chun <i>et al.</i> ⁵¹	x	x	x	x	x					x				
Nam <i>et al.</i> ⁵²	x	x	x	x		x	x				x			

Adaptado de: “Herramientas para el manejo del cáncer de próstata” de Gómez Rodríguez A, Loiziaga Iriarte A, Bachiller Burgos J y Borque Fernandez A, perteneciente al libro “Actualización en Cáncer de próstata. Desde el diagnóstico a la resitencia a la castración” (Ed. IMC. Madrid 2016).

a.- Modelos predictivos para diagnóstico de cáncer en la biopsia. Comparativa de las características y validación de cada modelo.

Modelos/ variables	Año	Tipo	N	Validación Interna Validación Externa				
				Calibración	Discriminación	Curvas de Decisión	Discriminación	Curvas de Decisión
Optenberg <i>et al.</i> ⁴⁴	1997	Tabla de probabilidad	633	Gráfico	0,80	Gráfico	0,761	--
Bababian <i>et al.</i> ⁴⁵	1998	Grupos de Riesgo	151	--	0,94	--	--	--
Eastham <i>et al.</i> ⁴⁶	1999	Nomograma	700	Gráfico	0,75	--	--	--
Garzotto <i>et al.</i> ⁴⁷	2003	Nomograma	1239	--	0,73	--	--	--
Karakiewicz <i>et al.</i> ⁴⁸	2005	Nomograma	6469	Gráfico	0,78	Gráfico	0,69 - 0,77	--
Suzuki <i>et al.</i> ⁴⁹	2006	Nomograma	824	--	0,81	--	--	--
Thompson <i>et al.</i> ⁵⁰	2006	Calculadora de riesgo	5519	--	0,70 – 0,69	Gráfico	0,56 – 0,72	Si
Chun <i>et al.</i> ⁵¹	2007	Nomograma	2900	Gráfico	0,76	Gráfico	0,72 – 0,75	--
Nam <i>et al.</i> ⁵²	2007	Nomograma/ calculadora de riesgo	3108	Gráfico	0,74 – 0,77	Gráfico	0,67 – 0,72	Si

b.- Modelos predictivos tras prostatectomía radical.

Autor	Año	Estimación	N	Variables	Discriminación	
					Interna	Externa
Predicción preoperatoria de recidiva bioquímica						
D'Amico et al. ⁵³	1998	3-5 años	888	Gleason-Bx, estadio clínico, PSA	--	65- 70%
Stephenson et al. ⁵⁴	2005	1-10 años	1978	Gleason-Bx, estadio clínico, PSA, año de intervención, número de cilindros positivos y negativos	76%	75-79%
Predicción postoperatoria de recidiva bioquímica						
D'Amico et al. ⁵³	1998	2 años	862	Gleason-Bx, estadio patológico, PSA, márgenes quirúrgicos	--	--
Walz et al. ⁵⁵	2009	2 años	2911	Gleason-Bx, estadio patológico, PSA, márgenes quirúrgicos	--	82%

Adaptado de: “Herramientas para el manejo del cáncer de próstata” de Gómez Rodríguez A, Loiziaga Iriarte A, Bachiller J y Borque A, perteneciente al libro “Actualización en Cáncer de próstata. Desde el diagnóstico a la resitencia a la castración” (Ed. IMC. Madrid 2016).

c.- Modelos predictivos tras rescate al tratamiento primario (radioterapia y prstaetctomía radical) y tras tratamiento en enfermedad diseminada.

Autor	Año	Estimación	N	Variables	V. Int	V. Ext
Predicción de progresión tras radioterapia de rescate						
Stephenson <i>et al.</i> ⁵⁶	2007	A 6 años	1540	PSA, Gleason-pieza, estadiopT, estadio pN, márgenes, PSA postprostatectomía y prerradioterapia, PSADT, hormonoterapia neoadyuvante, dosis de radioterapia	69%	--
Predicción de supervivencia al cáncer específica tras hormonoterapia postprostatectomía						
Porter <i>et al.</i> ⁵⁷	2007	A 2, 3, 4 y 5 años	114	Estadio pT, Gleason-pieza, márgenes, edad, tipo de recidiva	66%	--
Supervivencia global tras tratamiento sistémico en enfermedad diseminada						
Samletz <i>et al.</i> ⁵⁸	2002	A 1 y 2 años	409	Karnofsky, hemoglobina, LDH, fosfatasa alcalina, albúmina	71%	67%
Svatek <i>et al.</i> ⁵⁹	2006	A 1, 2, 3, 4 y 5 años	129	PSA, PSADT, nadir de PSA, tiempo en hormono-sensibilidad	81%	--
Halabi <i>et al.</i> ⁶⁰	2014	A 18, 24, 30, 36 y 48 meses	1050	Estado funcional (ECOG), lugarde afectación, LDH, uso de opioides analgésicos, albúmina, hemoglobina PSA, fosfatasa alcalina	73%	76%

A2.- Carcinogénesis y modelo metastásico del cáncer de próstata.

Conceptos de EMT y “*dormancy*”.

La mayoría de las muertes del CaP se producen en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica al diagnóstico. Como veremos en los siguientes apartados, las CTCs han demostrado tener un importante papel en el desarrollo de estas metástasis y su presencia en sangre se ha asociado claramente a un peor pronóstico. No obstante, antes de adentrarnos en las relaciones de las CTCs con el pronóstico del CaP, creemos conveniente explicar detalladamente dos conceptos clave para entender el conocimiento actual sobre el proceso metastásico de este tumor: la latencia celular o *dormancy*, y la transformación epitelio-mesénquima o *EMT* (figura 4).

A2.1.- Latencia celular o “*dormancy*”.

La historia natural del CaP se caracteriza por largos períodos de enfermedad asintomática que, ahora se sabe, son debidos a un estado de latencia celular (*dormancy*) y que constituyen un comportamiento típico de distintos tumores sólidos. En un momento determinado, estas células pueden recobrar su actividad, distribuirse por el cuerpo (principalmente el hueso) y generar metástasis clínicas.

El término “*dormancia*” fue acuñado por el patólogo Australiano Robert A. Willis en la primera mitad del siglo XX. Se trata de un estado en que la célula permanece quiescente, en fase G0, sin entrar en fase proliferativa. Clínicamente implica un lapso de tiempo prolongado entre el comienzo del tumor primario y el desarrollo de recidiva. La **latencia celular o *dormancia*** es, probablemente, una fase del proceso metastásico en la cual las CTCs son capaces de sobrevivir en condiciones extremas durante largos períodos de tiempo en forma de células tumorales diseminadas (*disseminated CTCs o dCTCs*) en distintas localizaciones, por ejemplo, en la médula ósea. Este proceso puede tratarse de un mecanismo de adaptación a nuevos microambientes que permite a las CTCs cambiar su “apariencia” y dotarse de una gran plasticidad fenotípica y genética. Esta plasticidad celular

se ha relacionado con la potencialidad de estas células tumorales para presentar propiedades de células progenitoras -células progenitoras del cáncer o *cancer stem cells* (CSC) -.

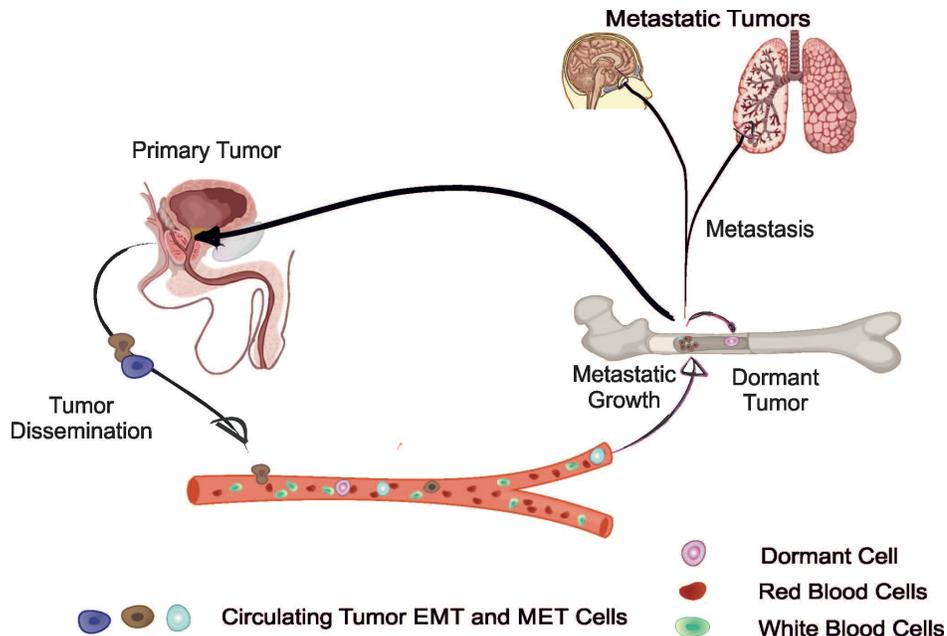


Figura 4. Proceso EMT. Salida de las células tumorales desde el tumor primario hasta distintas localizaciones metastásicas y posibilidad de entrada en estado de latencia (*dormancy*).

Existen distintos estudios que han estudiado la biología molecular que subyace a la dormancia. Parece estar relacionada con el **equilibrio entre las vías del RAF-MEK-ERK y la vía del p38MAPK** (61,62). Sin embargo, aunque parece claro que estos mecanismos están implicados en el proceso, no son suficientes para explicar el modelo por sí solos. La activación de estas vías implica, a su vez, la activación de diferentes cascadas y transformaciones biológicas como la **transformación epitelio mesénquima (EMT)** (63), o la **reprogramación metabólica (MetR)**, las cuales pueden estar implicadas en el mantenimiento de la dormancia y la supervivencia de las CTCs. (64).

La **alteración del metabolismo celular** es una consecuencia común de los cambios en el microambiente celular y parece jugar un importante papel en la dormancia. La alteración o desequilibrio de las vías relacionadas con la hipoxia o la inflamación son unas de las causas más estudiadas. Bajo condiciones de hipoxia los factores de transcripción

Snail y **TWIST** se autoregulan al alza gracias al factor inductor de hipoxia (HIF-1a), y cooperan de forma conjunta para aumentar la expresión del **factor de transcripción Zeb-1 (65)**. Mediante esta vía, la hipoxia aumentaría la actividad de la β -catenina, que promueve la expresión de Snail y, en consecuencia de los procesos de EMT. De esta manera, parece demostrado que los genes Snail y TWIST codifican factores que promueven la EMT y la angiogenesis tumoral facilitando la adaptabilidad tumoral a nuevos ambientes. A pesar del papel innegable del fenotipo metabólico celular en el proceso de dormancia y metastásico, muy pocos estudios han analizado su relevancia en el plano más clínico. Sin embargo, se están llevando a cabo mucha investigación básica sobre el metabolismo tumoral (proteómica y metabolómica) que seguro ayudará a encontrar nuevas dianas terapéuticas en el futuro.

El **gran reto** de la biología molecular oncológica actual es ser capaz de detectar y diferenciar cuales son las células tumorales con capacidad de metastatizar y poder desarrollar mecanismos para frenarlas (figura 5). Se sabe que solo una parte de las células tumorales son capaces de diseminarse a sangre, sobrevivir, depositarse en otros órganos y producir enfermedad metastásica. El hecho de que en una enfermedad neoplásica coexistan distintos tipos celulares se conoce técnicamente como **heterogeneidad tumoral**. Actualmente existen dos modelos hipotéticos para explicar este fenómeno:

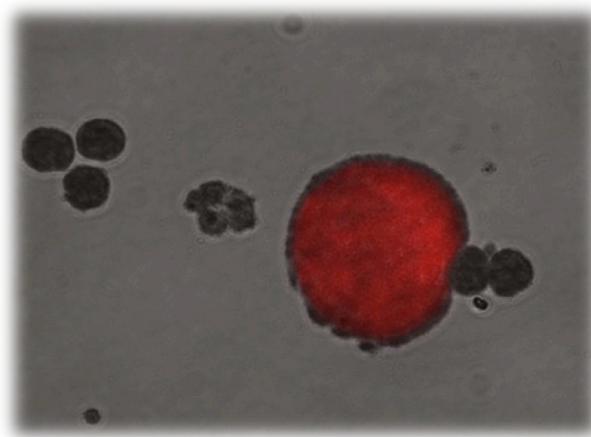


Figure 5. Imagen tomada mediante microscopia confocal de una CTC en un paciente con cáncer de prostata metastásico. El color rojo destaca la presencia de citoqueratinas específicas. El reto biológico actual es saber determinar cuáles de estas células son capaces de metastatizar y favorecer la progresion de la enfermedad.

- Modelo estocástico o probabilístico: basado en que todas y cada una de las células del tumor primario tienen la misma capacidad potencial de iniciar y mantener a progresión tumoral y metastásica. Para que esto ocurra, es necesaria la confluencia de una gran cantidad de eventos facilitadores o errores moleculares y, por probabilidad, la mayoría de las células del tumor no entran nunca en esta fase. Cuando confluyen todas las condiciones necesarias, se desarrolla la enfermedad metastásica.

- Modelo alternativo de latencia celular: se explicaría por la capacidad del tumor para mantener características de normalidad dentro del tejido en que se encuentra. El modelo se basa en la presencia de células maduras no proliferativas o latentes (*dormant cells*), representantes de una subpoblación de células progenitoras cancerosas (PCCs). Las PCCs tienen capacidad de autorenovación y capacidad de derivar en células biológicamente distintas a las del tumor primario. De forma interesante, recientes estudios han demostrado que las células con características EMT pueden desarrollar capacidades pluripotenciales, similares a las células progenitoras. Sobre este modelo, la identificación y caracterización de las células progenitoras (PCCs) o de las células durmientes (*dormant cells*) podría suponer una diana terapéutica.

El proceso de dormancia como primer paso de la metástasis.

Distintos autores han propuesto que el proceso de dormancia constituye una fase inicial en el proceso general de la metástasis y la recidiva clínica, especialmente en el CaP (66, 67). En un momento determinado, algunas células del tumor primario, pasarían al torrente sanguíneo, se establecerían en determinados órganos diana y podrían entrar en una fase latente durante un tiempo. Posteriormente, se ha demostrado que estas células “atrapadas” en fase G0 (células durmientes, diseminadas o **dCTCs**) pueden volver a reactivarse bajo distintos estímulos externos (citoquinas, nutrientes, agentes químicos).

La mayoría de estudios analizan el papel de los mecanismos moleculares y funcionales implicados en la metastasis, pero son menos los estudios que analizan el papel de la dormancia en el proceso, cuyos mecanismos intrínsecos aún no están claros. La hipótesis de partida son los pacientes en los cuales se ha eliminado el tumor primario de forma completa y, mucho tiempo después, desarrollan metastasis a distancia que no se habían observado previamente. Se ha demostrado la presencia de dCTCs en la médula ósea de pacientes supuestamente “limpios” de tumor (68). El microambiente de la médula ósea ha sido objeto de estudio en los últimos años.

En un **microambiente como la médula ósea**, se sabe que las células pueden inducir la liberación de citoquinas como las **proteínas Wnt**, que son inhibidores de las proteínas morfogenéticas de hueso (*bone morphogenetic proteins o BMP*, pertenecientes a la familia del TGF) y activadores de la vía notch-delta, capaces de mantener la **autorenovación celular** (66). En el caso de las **BMP7** secretadas por el estroma de la médula ósea, se ha demostrado que son capaces de inducir senescencia en las células progenitoras de cáncer de próstata. Esta senescencia celular se desencadenaría con la activación de la **vía p38** y el aumento de expresión de **p21** (inhibidor del ciclo celular) y del gen supresor de metástasis **NDRG1** (N-myc downstream-regulated gene 1). La expresión de **BMPR2** (BMP receptor 2) también tendría un papel en este proceso. Por todo ello, se piensa que el **eje BMP7-BMPR2-p38-NDRG1** juega un papel crucial en el proceso de dormancia y la recidiva del CaP en el hueso (69).

A2.2.- Transición epitelio mesénquima (EMT)

Para el desarrollo de las metástasis son necesarios una gran cantidad de pasos sucesivos a nivel biomolecular. La transición epitelio-mesénquima ha sido señalada como uno de los pasos más importantes del proceso. Aunque los procesos de EMT son conocidos desde hace tiempo por su papel embriológico durante el desarrollo y migración celular de los tejidos en vertebrados, fue con muchos años después cuando se observó que estos mismos procesos se producían durante el proceso metastásico de distintos carcinomas.

Básicamente, este proceso consiste en la pérdida de características o marcadores epiteliales (**E-cadherina**) y la sobreexpresión de características o marcadores mesenquimales (**vimentina**, **N-cadherina**), resultando en la pérdida de la capacidad de adhesión celular y en el incremento de la capacidad de movilidad (figura 6).

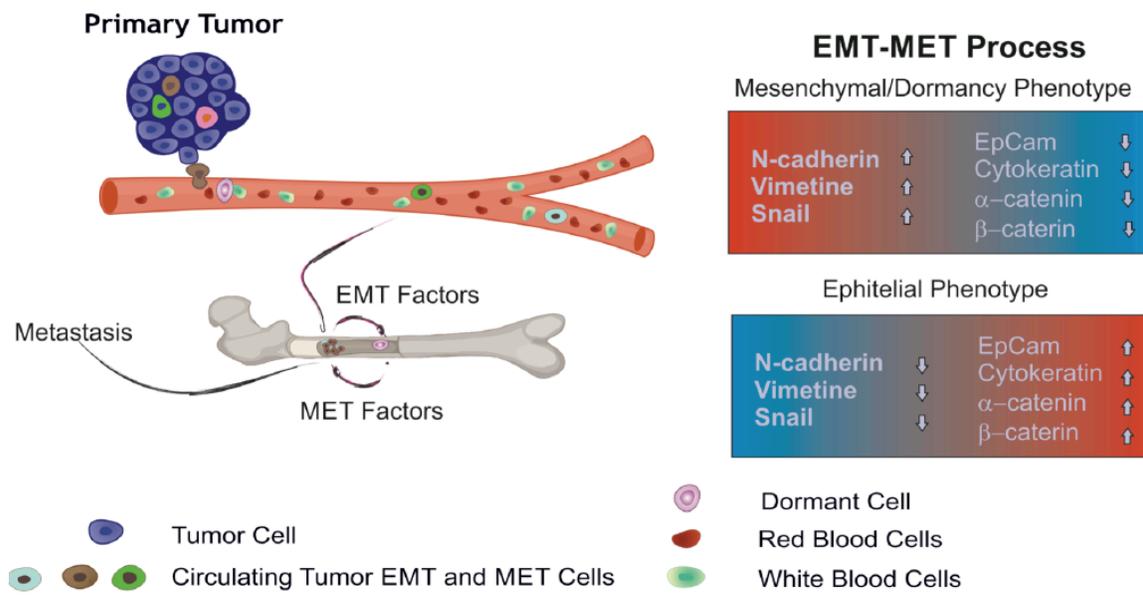


Figura 6. Modelo de proceso EMT-MET en cáncer de próstata. Principales marcadores moleculares implicados.

El proceso metastásico es “muy poco eficiente”. De todas las CTCs que pasan a sangre, solo unas pocas serán capaces de sobrevivir, de pasar a otros tejidos y de generar enfermedad. Distintos estudios apuntan a que la posibilidad de que todo esto ocurra depende en primer lugar, de la capacidad de las células para adquirir un fenotipo EMT que les permita sobrevivir en la sangre y no sucumbir a la apoptosis; y en segundo lugar, de la capacidad de las células de revertir ese proceso, la transición mesénquima-epitelial (MET) para poder producir la metástasis continuando con su crecimiento epitelial en el órgano diana (70).

A modo de muy brevísimo resumen, se podría decir que en cáncer de próstata, la evidencia actual indica que el proceso EMT es un evento pre-metastásico que depende del microambiente celular y es inducido por factores como el **TGF (BMP7), FGF, receptor de estrógenos β , receptor de andrógenos, Snail, TWIST, Zeb1, proteínas Wnt, microARNs y eventos epigenéticos** (71).

A través de estos factores, las CTCs adquieren la capacidad de sobrevivir en la sangre. Una vez llegan a su órgano diana, las células necesitan adaptarse a un nuevo microambiente, el propio órgano diana podría inhibir el crecimiento celular y facilitar la entrada de la célula en un estado de quiescencia (dormancia) que, entre otras, depende de la activación de vías antiapoptóticas. Así, EMT y dormancia mantendrían una relación cooperativa necesaria para el desarrollo efectivo de las metástasis (72).

Recientemente, se ha observado que los microARNs juegan también un papel importante en este proceso. Los **microARN** son pequeños fragmentos de ARN capaces de modificar la expresión genética a nivel pos-transcricional. Su estudio es complejo, ya que se sabe que un mismo microARN puede funcionar como oncogen o como gen supresor de tumor dependiendo del contexto del tipo celular. Es por ello, precisamente, que se piensa que los microARN esconden la clave del proceso de transformación y reversión del EMT-MET, serían los “masters regulators” de la metástasis.

En el cáncer de próstata, tienen especial importancia la familia de los **miARNs 200**. La pérdida de expresión de la familia de miR-200 se ha asociado con la expresión de fenotipo EMT y la invasión metastásica; la sobreexpresión de miR-221 y miR222 está asociada al CPRC; y miR-203 y miR-205 se han relacionado con la supresión metastásica al frenar el proceso EMT (73).

EMT y Dormancy como fuente de dianas terapéuticas en cáncer de próstata.

Actualmente, la principal y casi única diana terapéutica en el cáncer de prostata es la vía del receptor de andrógenos. Sin embargo, se sabe muy poco sobre otras vías que pudieran constituir nuevas dianas de la enfermedad. Toda la gran cantidad de marcadores enumerados previamente, e involucrados en los procesos de dormancia y EMT, tienen una gran importancia clínica, pues constituyen potenciales targets o dianas terapéuticas distintos a la vía de los andrógenos.

En principio, habría dos formas de enfocar un tratamiento dirigido a la dormancia:

1.- Mantener las células en latencia o dormancia de forma indefinida.

2.- Eliminar las células latentes

El principal escollo que encontramos a la hora de dirigir los tratamiento a estas células, es que generalmente constituyen un conjunto celular indetectable y en localizaciones complejas para analizar (generalmente hueso). Por ello, el estudio de las CTCs en sangre puede aportar información de forma más sencilla que el estudio de las dCTCs..

Se sabe que entre 10 - 30% de los pacientes con cáncer de próstata o mama presenta metástasis óseas, sin embargo se pueden detectar dCTC en médula ósea hasta en el 50% de estos pacientes (74). Esto sugiere que no todas las CTCs son activas y que no todas las

metástasis producen enfermedad, es solo cuestión de encontrar los marcadores adecuados. Aunque actualmente no existen ningún tratamiento específicamente aprobado frente al EMT o la dormancia, si existen muchos trabajos prometedores. Procederemos a resumir los más destacados en la actualidad.

Como hemos mencionado antes, una de las vías más importantes en el eje **BMP7–BMPR2–p38–NDRG1**. La BMP7 pertenece a la familia del *factor de crecimiento tumoral (TGF)* y regula distintas funciones de crecimiento celular normal, como el crecimiento óseo. Es secretado por las células de la médula ósea y es capaz de inducir senescencia celular. De forma característica, se ha observado como la expresión de receptor de BMP7 (BMPR2) se relaciona de forma directa con la supervivencia libre de progresión y de forma inversa con la presencia de metástasis en el cáncer de próstata (75). Teniendo en consideración que el **BMP7** está actualmente aprobado por la FDA como tratamiento para las fracturas óseas, este podría constituir un potencial arma terapéutica justificada en el cáncer de próstata.

Además, distintos estudios han encontrado acciones complementarias entre la **BMP7 y la vía del receptor de andrógenos** que resultan muy interesantes desde el punto de vista clínico. BMP7 parece modificarse según el estatus de andrógenos, el cual está asociado también a la edad. Se ha demostrado que la expresión de mRNA de BMP7 aumenta con los andrógenos y disminuye tras la orquiectomía. De esta manera, tanto la terapia de privación androgénica (TDA) como la andropausia podrían ser causa de disminución de BMP7, lo cual podría facilitar procesos de EMT y dormancia (75). Según esta hipótesis la TDA, el tratamiento más empleado para el cáncer de próstata, favorecería la progresión del cáncer. Como veremos a lo largo de esta tesis, es una conclusión a la que han llegado ya distintos estudios, y que supone que el propio tratamiento del cáncer podría favorecer el desarrollo de resistencias. Por tanto, esta línea de investigación está plenamente justificada.

El factor de transcripción Forkhead box M1 (**FoxM1**) está relacionado con la pathogenesis de distintas neoplasias y distintos estudios apuntan a su capacidad de inducir

cambios EMT en cáncer de mama. Un reciente experimento en líneas celulares de cáncer de próstata demostró que la **metformina** es capaz de inhibir procesos EMT a través de la inhibición de FoxM1. De esta manera, se demostró el potencial efecto antitumoral de la metformina, junto con un potencial uso en cáncer de próstata (76).

Ya hemos hablado previamente de la importancia de los **miR-200** en el cáncer de próstata. La translocación cromosómica de la proteína serina transmembrana 2, sensible a andrógenos (TMPRSS2), con el factor de transcripción oncogénico ERG (**TMPRSS2-ERG**) resulta en una sobreexpresión de ERG en el 50% de los pacientes con cáncer de próstata. Pues bien, un reciente estudio observó que el miR-200c era la principal diana del ERG y un inhibidor crítico de la motilidad celular. Más interesante aún, el experimento demostró que la reconstitución celular con miR-200c era capaz de revertir completamente los cambios EMT previamente inducidos por la sobreexpresión del ERG. De este modo, los autores proponían que un tratamiento adecuado encaminado a recomponer los niveles de miR-200c podría ser beneficioso para pacientes con cáncer de próstata portadores de la **traslocación TMPRSS2-ERG** (77).

Como vemos, poco a poco se descubren nuevas vías y marcadores como potenciales dianas en el cáncer de próstata. Dada la conocida **heterogeneidad biológica** de esta enfermedad, resulta imprescindible conocer al detalle la biología molecular de la misma para poder ofrecer tratamientos personalizados según las características del tumor de cada paciente. En este sentido, los mecanismos de EMT y dormancia ofrecen enormes posibilidades. Probablemente, en el futuro, el tratamiento clásico sobre el eje del receptor de andrógenos se vea complementado con la acción terapéutica sobre estas nuevas vías.

A3.- Biopsia líquida en cáncer de próstata. Conocimiento actual.

A3.1.- Concepto de biopsia líquida:

El *National Institute of Health* (NIH) americano definió hace unos años a la biopsia líquida como “*toda aquella prueba que se realiza en una muestra de sangre con el fin de buscar células cancerosas circulantes en la sangre, o bien fragmentos de ADN de esas células tumorales circulantes*”. Sin embargo, esta definición pronto quedó obsoleta. Como veremos a continuación, actualmente el concepto de biopsia líquida es **mucho más amplio** y engloba también otros tipos de análisis (**exosomas, ARN o proteínas**, entre otros), siempre realizados a través de un fluido corporal del paciente y de forma mínimamente invasiva.

El crecimiento y desarrollo de este área del conocimiento científico-médico ha sido exponencial en los últimos años. Durante la última década, hemos asistido a una auténtica oleada de trabajos científicos acerca de la biopsia líquida en casi todos los tipos de tumores. En este escenario, es preciso resaltar el papel activo que la ciencia granadina, y concretamente el Centro Genyo, han tenido y están teniendo en la labor de divulgación y desarrollo de la biopsia líquida oncológica al más alto nivel. La reciente creación de la *Sociedad Internacional de Biopsia Líquida* (SIBL o ISLB por sus siglas en inglés) el pasado mes de Abril de 2016 en la ciudad de Granada, tuvo su origen en los profesionales científicos de este Centro, quienes consiguieron reunir la colaboración necesaria con grupos internacionales de reconocido prestigio para llevar a cabo el proyecto. Este hito en el desarrollo de la biopsia líquida oncológica es una clara muestra del reciente e imparable desarrollo de esta disciplina, y del destacado papel de nuestra ciudad en la misma.

La SIBL define la biopsia líquida como un “*test mínimamente invasivo que se realiza utilizando un fluido corporal (sangre, orina, semen, líquido cefalorraquídeo) y que permite la detección de biomarcadores celulares o moleculares con el fin de obtener información diagnóstica, pronóstica o predictiva de la enfermedad*”. En nuestro caso, la enfermedad es el cáncer, pero no es un concepto limitado exclusivamente a la oncología.

La biopsia líquida se puede utilizar para ayudar a encontrar un cáncer en un estadio temprano. También puede ser útil para ayudar a planificar el tratamiento, determinar su eficacia y detectar la recidiva. La posibilidad de tomar varias muestras de sangre a lo largo del tiempo también ayuda a los médicos a entender la clase de cambios moleculares que están ocurriendo en un tumor. Este **triple potencial diagnóstico, pronóstico y predictivo “a tiempo real”**, ha convertido a la biopsia líquida en la principal línea de investigación en oncología a día de hoy.

El **cáncer de próstata**, en particular, constituye un ejemplo claro para comprender la necesidad de nuevos biomarcadores y la importancia del desarrollo de la biopsia líquida. Como hemos repasado en los capítulos anteriores, el cáncer de próstata presenta una historia natural muy cambiante y variable, probablemente debida a numerosos cambios genéticos y selecciones clonales a lo largo de su evolución y tratamiento. En otros tumores, la biopsia tisular del tumor, o de sus metástasis, permiten descifrar biomarcadores pronósticos y predictivos con más facilidad; sin embargo, la principal metástasis del cáncer de próstata es al hueso, lo cual supone una importante barrera en la obtención de muestras para su análisis y monitorización molecular. La biopsia líquida se plantea como la solución a este problema.

A3.2.- Tipos de biopsia líquida.

Existen, fundamentalmente 4 tipos de marcadores a estudiar en biopsia líquida oncológica: células de tumor circulantes (CTCs), ADN celular libre (cfDNA), exosomas y proteínas.

A3.2.1.- Células circulantes de tumor (CTCs)

Las CTCs son células procedentes del tumor, que se encuentran en el torrente sanguíneo en una proporción estimada de **1:1.000.000 células**. Según el modelo actual del proceso de metástasis, estas células serían liberadas al torrente sanguíneo desde el tumor primario y, tras adquirir una serie de características y sufrir determinados cambios aún por esclarecer, serían capaces de alcanzar otros órganos diana y provocar enfermedad metastásica a distancia (figura 7).

Si las CTCs son liberadas a sangre de forma “aleatoria” o si su paso al torrente sanguíneo se produce de forma sistematizada según distintas expresiones moleculares, es una pregunta aún sin respuesta. Sí parece claro, que el microambiente circulatorio para una célula epitelial (CTC) es “duro”, y una vez en la sangre, la **vida media** de una CTC es muy corta (entre 1 y 2.4 horas) (78), por lo que es muy probable que deba someterse a un proceso de selección muy exhaustivo, para poder sobrevivir y ser capaz desarrollar enfermedad a distancia. Una prueba de estas duras condiciones es la frecuencia con que son encontradas CTCs fragmentadas o en apoptosis (79).

Es posible que durante el difícil trayecto dentro del torrente circulatorio, para poder sobrevivir, las CTCs pierdan algunas de sus características epiteliales y adquieran características mesenquimales (**transformación epitelio mesénquima o EMT**), y que además, su diseminación se vea facilitada por **otros actores celulares**. Las células del sistema inmune (p.e. plaquetas activadas o macrófagos) parecen jugar un papel importante (80). Además, se ha observado la formación de agregados celulares capaces de adherirse a

la barrera endotelial (81) o que la presencia de gradientes favorables de quimiocinas podría guiar su destino a otros órganos (CXCR4, CCR4, CCR7, CCR9) (82).

Si bien el modelo clásico supone a la CTCs distribuyéndose desde un tumor primario hacia otros órganos diana, hoy día se ha demostrado también el proceso inverso. En ratones a los cuales se les ha extirpado su tumor primario, se ha observado que las distintas metástasis pueden también generar CTCs que, a su vez, pueden volver a su órgano de origen inicial, provocando una recidiva local. A este proceso se le ha llamado “**self-seeding**” tumoral (83).

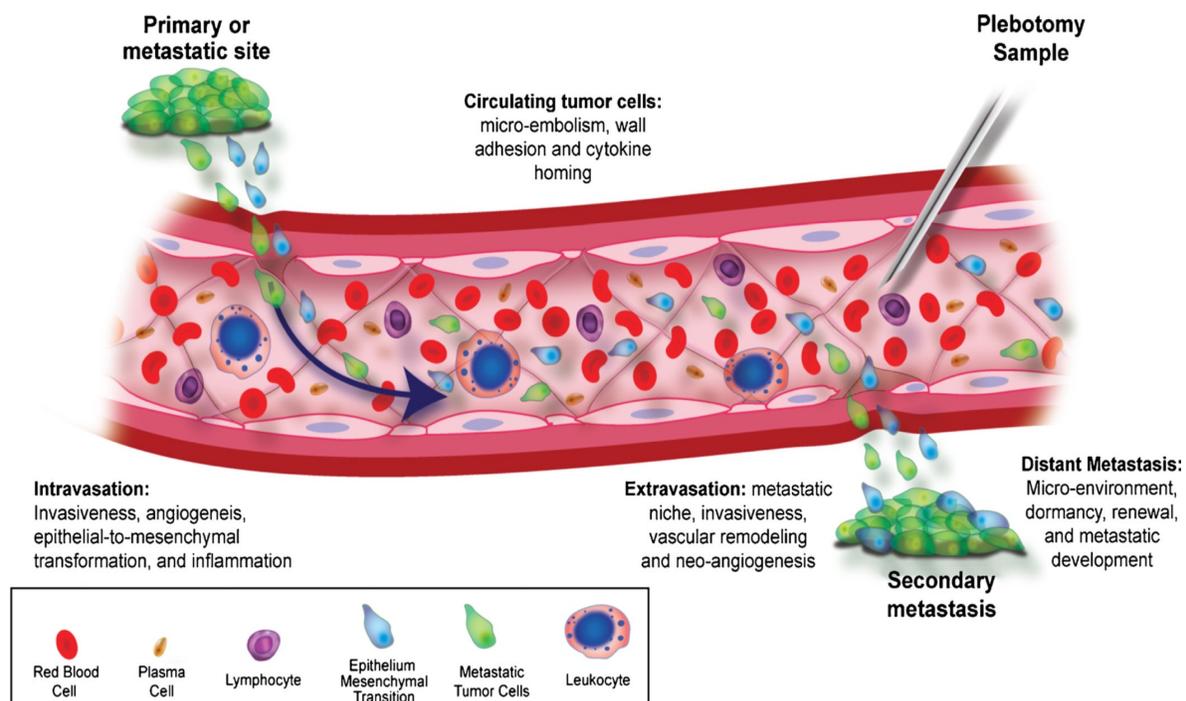


Figura 7: Según el modelo actual del proceso de metastasis, estas células serían liberadas al torrente sanguíneo desde el tumor primario y, tras adquirir una serie de características y sufrir determinados cambios aún por esclarecer, serían capaces de alcanzar otros órganos diana y provocar enfermedad metastásica a distancia (*Dormant Circulating Tumor Cells In Prostate Cancer: Biological, Clinical And Therapeutic Implications. Álvarez Cubero MJ, et al. Curr Drug Targets 2016;17(6):693-701.*)

¿Cómo detectamos las CTCs en sangre?

Para poder comprender el potencial clínico de las CTCs es preciso conocer los distintos pasos y posibilidades que ofrece su análisis. Todos los test para el análisis cuantitativo de CTCs en sangre periférica requieren, generalmente, de 3 pasos básicos:

a.- **Fase inicial preparatoria:** centrifugación, lavado y/o adición de conservadores celulares que evitan la entrada de la CTC en apoptosis hasta 72-96 horas.

b.- **Fase de enriquecimiento o aislamiento celular:** puede basarse en técnicas inmunomagnéticas (lo más frecuente) o en las propiedades físicas o eléctricas de las CTCs. Recientemente, han aparecido técnicas que prescinden de esta fase de enriquecimiento (*enrichment-free systems*).

c.- **Fase de identificación/caracterización celular:** tras el aislamiento, la identificación y caracterización celular se basa en distintas técnicas sobre las proteínas y/o ácidos nucleicos de las CTCs. Luego, el recuento celular se realiza mediante diversos métodos de imagen semiautomáticos y dependientes, en mayor o menor medida, del criterio de un técnico analista formado específicamente.

El **aislamiento inmunomagnético** permite utilizar anticuerpos específicos frente a las células y realizar una selección positiva (p.e: células anti-EpCAM positivas) o negativa (p.e: anti-CD45 negativas). También se pueden detectar proteínas específicas del cáncer de próstata como el antígeno de membrana próstata-específico (PSMA).

De forma alternativa, se desarrollaron técnicas para aislar las CTCs del resto de células basándose en sus **propiedades físicas** (tamaño, deformabilidad) o **eléctricas**. Estas técnicas tienen la desventaja de tener una baja capacidad de discriminación dado el solapamiento de estas características entre células similares (principalmente leucocitos). No

obstante, son técnicas considerablemente más económicas que las técnicas basadas en marcadores inmunomagnéticos.

Las siguientes características físicas y biológicas están ampliamente aceptadas como propias de las CTCs:

- ✓ morfología oval o redondeada
- ✓ tamaño > 5 μm
- ✓ núcleo visible (4'6-diamidino-2-fenilindol positivo, DAPI+)
- ✓ positividad a citoqueratina 8, 18, y/o 19 (ficoeritrina)
- ✓ negatividad para CD45 (aloficocianina).

Las modificaciones sobre estas características pueden aumentar el número de células detectadas, pero podría debilitar su valor pronóstico.

El desarrollo del enriquecimiento celular también ha llevado a la aparición de **sistemas de selección compuesta** en los que las células primero se conjugan con anticuerpos anti-EpCAM y posteriormente se seleccionan según sus características físicas a través de un diseño arquitectural multiobstáculo.

Respecto a la fase de identificación celular, nuestro grupo utiliza un **microscopio confocal** que permite una visualización precisa de la célula precisa; si bien, esta modalidad requiere de formación y experiencia por parte del técnico encargado. De cara al futuro, el **escaneado con fibra óptica** es una nueva técnica que permitirá analizar la totalidad de las células de una muestra de manera eficiente. No precisa de la utilización de marcadores de selección celular, sino de la lisis de eritrocitos, siendo así menos vulnerable a la pérdida de células. Uno de los motivos para desarrollar estas tecnologías es el estudio directo de los clusters de CTCs (agrupaciones celulares de CTCs) más que el análisis individual de una sola célula.

✓ *Sistemas detección de CTCs*

En los siguientes párrafos, trataremos de explicar en detalle las diferencias entre los distintos sistemas más utilizados en la actualidad para la detección de CTCs.

- **CellSearch System™ test:**

Aunque fue desarrollado y validado clínicamente hace más de 10 años, sigue siendo el único test aprobado por la FDA para la detección de CTCs (Veridex, LLC, Raritan, NJ, USA). Constituye la plataforma estándar (gold estándar) sobre la cual comparar cualquier nuevo test emergente. Este test fue aprobado por la FDA en 2012 basándose en sus resultados en varios ensayos clínicos aleatorizados y multicéntricos en cáncer de mama, colorectal y de próstata (84). Este sistema detecta, enriquece y cuantifica células tumorales de origen epitelial basándose en la expresión de la molécula de adhesión epitelial (EpCAM).

Recogida de la muestra y envío: se deben recoger 20cc de sangre periférica en 2 tubos especiales (CellSave Tubes Veridex) de 10cc cada uno. Los tubos se deben almacenar a temperatura ambiente entre 15° y 30° durante no más de 96 horas desde el momento de la extracción. Inmediatamente tras la extracción es importante repartir bien la muestra sanguínea por las paredes del tubo, mediante al menos 8 movimientos suaves de inversión del mismo. No realizar esta maniobra puede provocar coágulos y la imposibilidad de analizar la muestra.

La casa comercial establece una serie de valores límite de la normalidad de acuerdo a los resultados de los ensayos que validaron el test:

Metastatic breast cancer: <5 CTCs/7.5 mL blood

Metastatic colorectal cancer: <3 CTCs/7.5 mL blood

Metastatic prostate cancer: <5 CTCs/7.5 mL blood

Valores por encima de estos puntos de corte han mostrado ser predictores independientes de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en cáncer de mama, colon y próstata (84-86).

Métodología: La plataforma CellSearch fue el primer sistema automatizado, estandarizado y reproducible para la detección de CTCs de origen epitelial en sangre periférica. Mediante una identificación inmunomagnética, este sistema selecciona células epiteliales que expresan molécula de adhesión epitelial (EpCAM) y citoqueratinas (CK) 8, 18 y 19.

En primer lugar se realiza un enriquecimiento celular utilizando partículas magnéticas marcadas con anticuerpos anti-EpCAM que permite separar a aquellas células que expresen dicho antígeno. Después de la captura inmunomagnética, las células son marcadas con un tinción fluorescente para ácidos nucleicos 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Posteriormente, las células son enfrentadas con anticuerpos fluorescentes monoclonales para diferenciar leucocitos (CD45 +) y células epiteliales (citoqueratinas 8, 18 y 19 +). Finalmente, se generan fotografías de las muestras que pueden ser evaluadas por un técnico capacitado utilizando un microscopio fluorescente semiautomático (CellTracks Analyzer II). Con esta metodología, una CTC se define como una célula mononuclear DAPI+/CD45-/CK+.

Una vez aisladas las células DAPI+/CD45-/CK+ se puede posteriormente trabajar sobre ellas realizando técnicas sobre ADN (FISH), ARN (arrays) y fenotipado celular (PSA, HER-2/neu o EGFR).

Sin embargo, el sistema CellSearch tiene importantes desventajas. El exceso de tiempo empleado en la revisión de las imágenes y la necesidad de personal específicamente formado para realizar dichas revisiones es un hándicap a la hora de implementar la técnica en una rutina clínica. Su desventaja más importante ha sido recientemente señalada en distintos estudios que han demostrado la importancia de la pérdida del EpCAM durante el proceso celular metastásico. De este modo, el sistema CellSearch no estaría detectando una

parte importante de las células con capacidad metastásica dando lugar a falsos negativos en las determinaciones de CTCs mediante este sistema.

- **Perspectivas de futuro de los sistemas de detección de CTCs:**

El desafío futuro y motivo de investigación actual en el desarrollo de la detección de las CTCs es tratar de dilucidar el efecto que la **heterogeneidad tumoral** desempeña sobre las CTCs. Los sistemas basados en la selección mediante marcadores epiteliales no detectan aquellas células tumorales que han sufrido fenómenos de EMT (p.e. pérdida de EpCAM), que probablemente representen los clones más agresivos del tumor. Además, estos sistemas no serían válidos para tumores no epiteliales (sarcomas, melanoma). Las plataformas que utilizan varios anticuerpos a la vez para una selección compuesta junto con otras características celulares, podrían suponer un avance a este respecto. Esto, por supuesto, influirá en el coste del sistema.

Como se ha explicado anteriormente, el paso final de cualquier sistema de análisis cuantitativo de CTCs requiere de un sistema de imagen controlado por un observador cualificado, capaz de detectar las células seleccionadas. Este es otro punto de mejora futura en la detección de CTCs. Actualmente se están desarrollando algoritmos capaces de realizar el **contaje de forma totalmente automatizada**. De esta forma se evitará el riesgo de sesgo humano inherente a todos los sistemas de detección actuales.

Para ejemplificar la magnitud de este sesgo del observador, es interesante analizar los datos que valoraron la validez del sistema CellSearch. En un análisis posterior a la validación del sistema, Kraan et al (87), revisaron las mismas muestras de 6 pacientes en 13 laboratorios distintos. De forma interesante, observaron importantes inconsistencias en el contaje celular, las cuales ocurrían siempre en la fase manual del contaje y no durante la fase semiautomática, sobre todo en aquellas muestras con gran número de células apoptóticas o células muertas. Las nuevas tecnologías de detección totalmente automatizada de CTCs podrían ser la solución a este problema. No obstante, también

deberán demostrar su validez con nuevos ensayos clínicos antes de que puedan ser empleadas en la rutina clínica.

En conclusión, no existe en la actualidad el método ideal de detección y aislamiento de CTCs. **La selección del método dependerá de la intencionalidad de cada investigación.** Por ello, a la hora de elegir el más adecuado, es preciso conocer sus diferencias y las posibilidades que cada uno ofrece.

✓ *CTCs y cáncer de prostata.*

El CaP es actualmente objeto de pioneras investigaciones, que pretenden mejorar la comprensión de la biología molecular e historia natural de la enfermedad. De hecho, durante los últimos 10 años, nuevos e importantes descubrimientos han facilitado el desarrollo de numerosas moléculas que son ya una realidad en el armamentario terapéutico de nuestros pacientes. Sin embargo, a la misma vez, todos estos avances han puesto de manifiesto otra realidad: la **ausencia de biomarcadores adecuados** para la selección de los pacientes y para la valoración de la eficacia de estos nuevos fármacos.

La comunidad urooncológica está muy concienciada respecto a la necesidad de consenso en las definiciones y en los parámetros a evaluar para medir el beneficio clínico de los nuevos tratamiento en CaP. Desde su primera reunión en el año 1999, el prestigioso grupo internacional del *Prostate Cancer Working Group (PCWG)* se ha reunido en tres ocasiones para publicar una serie de recomendaciones que constituyen actualmente la **guía para el diseño de endpoints y la valoración de resultados en ensayos clínicos con biomarcadores en cáncer de próstata** (88, 89).

Estas recomendaciones establecen endpoints compuestos basados en la imagen (RMN, TC y gammagrafía), los niveles de PSA y los resultados clínicos. A pesar de ello, se hace referencia a las limitaciones de esta estrategia y a la necesidad de nuevos biomarcadores. Por ejemplo, el subgrupo de pacientes en estadio de resistencia a castración (CPRC) con enfermedad metastásica ósea no pueden ceñirse a los **criterios RECIST** tradicionales, pues éstos no encajan con el formato biológico de la enfermedad. Además, se ha demostrado reiteradamente la **baja correlación del PSA** con la supervivencia, y además, éste no es fiable en las fases más avanzadas de la enfermedad para realizar una monitorización de la enfermedad o valorar la respuesta a los tratamientos. En el caso de la gammagrafía, normalmente es necesario realizar una nueva gammagrafía de confirmación a los 6 meses de la aparición de nuevas lesiones, pues se ha descrito el fenómeno de **“flare up”** (aumento transitorio del número de metástasis) en respuesta al tratamiento con abiraterona.

Además de estas limitaciones, la alta prevalencia de enfermedad metastásica exclusivamente limitada a hueso ha limitado mucho la obtención de tejido para su análisis biomolecular. Los ensayos que se llevan a cabo actualmente se realizan sobre el material histológico de la biopsia o de la pieza de prostatectomía radical, con lo cual no se tiene en cuenta, ni se estudian correctamente, la selección clonal y los mecanismos de resistencia de la enfermedad metastásica. Las biopsias de médula ósea para estudio histológico de las metástasis se han realizado en algunos estudios pero su dificultad técnica y morbilidad para el paciente limitan mucho su uso en la práctica clínica habitual.

Por todo ello, la **biopsia líquida** tiene un gran potencial clínico en el CaP. La utilización de las **CTCs como un biomarcador sustituto o surrogado** de supervivencia global podría acelerar el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Además, el análisis molecular de las CTCs permitiría desarrollar el concepto de **medicina personalizada** pues facilita tener una “fotografía” de la enfermedad en tiempo real para cada paciente.

Repercusión clínica de la detección de CTCs mediante CellSearch™:

Como hemos visto anteriormente la detección de CTCs mediante CellSearch™ en pacientes con cáncer de mama, colon (CCR) o próstata, demostró ser un potente e independiente predictor de SLP y SG (84-86). En los ensayos clínicos que llevaron a su aprobación por la FDA, los pacientes se dividieron en 2 grupos según el recuento de CTCs. El grupo con pronóstico favorable incluyó a pacientes con una enumeración basal de CTCs $<5/7.5\text{mL}$; mientras que el grupo con pronóstico desfavorable incluyó a aquellos pacientes con una enumeración basal de CTCs $\geq 5/7.5\text{mL}$. Los pacientes en los grupos de pronóstico desfavorable tuvieron una PFS claramente inferior a los pacientes de los grupos de pronóstico favorable. Lo mismo ocurrió con la SG. Además, la detección de CTCs en cualquier momento del tratamiento fue un indicador de rápida progresión y menor supervivencia. En los pacientes metastásicos, las CTCs mostraron ser predictores de respuesta a tratamiento de forma más precoz que la disminución del PSA (2-5 vs 6-8 semanas) (84). Pero, **¿que evidencia hay del papel de las CTCs en el CaP localizado?**

- **CTCs en cáncer de próstata localizado. Problema actual.**

La detección de CTCs en los **estadios iniciales** de la enfermedad oncológica es actualmente un desafío para la investigación. Las **tasas de detección** de estas células son **muy bajas** cuando la enfermedad es incipiente, y la sensibilidad y especificidad de los actuales sistemas de detección tienen aún un amplio margen de mejora. El CaP no es una excepción a este respecto.

De forma específica, el sistema CellSearch™ ha demostrado tener una baja capacidad de detección de CTCs en pacientes con CaP localizado (90). Los resultados de éste y otros estudios sugieren que la tecnología actual para detectar CTCs en estadios iniciales del cáncer es aún limitada. Además, como se explicó antes, hasta un 34% de pacientes puede tener CTCs EpCAM negativas (invisibles al sistema CellSearch) debido a cambios relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT) (91).

Otro estudio de Davis et al. (92) también empleó el sistema CellSearch para estudiar a 97 pacientes con cáncer de próstata localizado y los comparó con un grupo control de pacientes con elevación del PSA sin cáncer demostrable en la biopsia. En este estudio se demostró una presencia de CTCs similar en ambos grupos (21% y 20%, respectivamente). Además, no se observó relación entre la presencia de CTCs y el volumen de tumor, el estadio patológico o la puntuación Gleason, lo cual llevó a los autores a concluir que las CTCs no tienen valor pronóstico en estos pacientes. Sin embargo, estas conclusiones nos parecen arriesgadas, sobre todo después de los resultados de distintos estudios, incluido el nuestro. El grupo control de este estudio no fue el ideal. Es conocida la baja especificidad de la biopsia para la detección del cáncer de próstata y la alta posibilidad de falsos negativos. Además, los pacientes no fueron sometidos a un seguimiento clínico posterior. De forma contraria, en otro estudio de Maestro y cols. demostraron la presencia de CTCs en el 100% de pacientes (26/26) con cáncer de próstata localizado de su serie, también utilizando el sistema CellSearch (93). Sin embargo, en este último estudio la definición de cáncer de próstata “localizado” fue probablemente demasiado laxa. Se calificó como

localizado a cualquier cáncer de próstata en ausencia de metástasis pero con cualquier afectación linfática, sin concretar más acerca del estadiaje de los pacientes.

Estos datos ponen de manifiesto las discrepancias actuales en torno a la detección de CTCs en estadios iniciales de la enfermedad. La mayoría de estudios apunta a una baja tasa de detección de CTCs en estos pacientes. Es posible que una muestra más amplia mejore estas tasas, pero también es posible que los sistemas de detección actuales no sean aún los más óptimos. Por ello son necesarios nuevas tecnologías que mejoren las tasas de detección de CTCs.

Posibilidades futuras:

a.- CTC-Chip: Stott et al. (94) idearon otra tecnología, el “CTC-Chip”, para mejorar la detección de estas células. Este chip contiene un array de 78.000 micropuestos que atrapan las células que expresan EpCAM. Posteriormente el chip se tiñe para detectar ácidos nucleicos (DAPI) y PSA. De forma totalmente automatizada, un microscopio-procesador analiza múltiples imágenes del chip y detecta las señales de ADN y PSA. Con esta metodología, Stott y cols. consiguieron una tasa de detección del 42% (8/19) en pacientes con cáncer de próstata localizado. Además, el número de CTCs detectadas fue bastante más alto que en el resto de estudios con CellSearch simple, detectando entre 38 y 222 CTCs por paciente.

Este nuevo método de detección soluciona el problema del sesgo del análisis operador dependiente al automatizar el proceso. Además, hace una selección más específica de CTCs prostáticas al incluir el PSA en el filtro. Sin embargo, sigue basándose en una selección inicial en base al EpCAM, con los consiguientes falsos negativos que esto entraña. Por ello, es todavía necesaria más investigación en esta materia.

b.- Actividad de telomerasa: otra forma de detectar CTCs es basándose en la actividad celular de la telomerasa. En un estudio sobre 107 pacientes se realizó el siguiente experimento (95). Inicialmente, se seleccionaron las células mononucleares de sangre

periférica. Sobre estas, las células epiteliales se seleccionaron utilizando un anticuerpo frente a un antígeno específico de células epiteliales (BerEP4). Tras ello, se analizó la actividad de la telomerasa en estas células. Con esta técnica, los autores fueron capaces de detectar CTCs en el 79% (19/24) de los pacientes con cáncer de próstata avanzado y en el 79% de los pacientes con cáncer de próstata localizado (55/70).

c.- Cultivos celulares: probablemente una de las capacidades más importantes y aún por explotar de las CTCs, sea su capacidad para **cultivarse in vitro** y, por tanto su potencial para someterse en el laboratorio a **tests de susceptibilidad** individual a determinados tratamientos, de la misma manera que se realizan los cultivos microbiológicos y sus antibiogramas (*“oncograma”*). El cultivo de CTCs se ha demostrado como posible en pacientes con CPRCm, pero probablemente aún queda un largo camino para su aplicabilidad clínica (96, 97).

Todas las perspectivas de futuro en la detección de CTCs pasan por conocer en detalle y determinar su **heterogeneidad** y/o **inestabilidad genética**. Estas parecen ser las características clave para determinar la agresividad de la enfermedad y en última instancia la resistencia a distintos tratamientos. Las nuevas tecnologías de detección y caracterización de CTCs parecen prometedoras, pero son aún necesarios estudios más amplios y con seguimientos a largo plazo, que demuestren la verdadera sensibilidad y especificidad de estas células para predecir la evolución del paciente.

- **CTCs en cáncer de próstata metastásico:**

A diferencia del CaP localizado, el valor de las CTCs como biomarcador pronóstico y predictivo en cáncer de próstata metastásico ha sido ampliamente demostrado en distintos estudios. Incluso se han llegado establecer niveles de referencia para diferenciar entre pacientes de buen y de mal pronóstico según el conteo de CTCs (p.e. $<$ o $>$ de 5CTCs/7.5mL, respectivamente).

El más famoso, y primero, de los estudios que validaron la capacidad predictiva y pronóstica de las CTCs en CaP metastásico fue el **IMMC38** (98). Aunque ya nos hemos referido a los aspectos técnicos de este estudio anteriormente, a continuación, describiremos los puntos más importantes del mismo desde una perspectiva más clínica. Se estudiaron un total de 164 pacientes con CPRCm que comenzaban tratamiento con quimioterapia y a los que se les determinaron CTC en intervalos de 3-4 semanas. Después de ajustar los datos según los principales indicadores pronósticos conocidos (LDH, ECOG, hemoglobina, fosfatasa alcalina) el análisis multivariante reveló que los pacientes con un conteo basal desfavorable (≥ 5 CTC/7.5mL) tenían una supervivencia global inferior a la de los pacientes con un conteo basal favorable (<5 CTC/7.5mL).

El IMMC38 también estudió la conversión de uno a otro grupo tras el tratamiento. Se evidenció que los pacientes que mantenían un conteo bajo (favorable) en todas las determinaciones fueron los que cuantificaron una mayor supervivencia global (26 meses), seguidos por los pacientes que pasaron de desfavorable a favorable (21.3 meses), los que pasaron de favorable a desfavorable (9.3 meses) y, por último, los que siempre permanecieron como desfavorables (6.8 meses).

Además, el conteo cualitativo de CTCs ($<$ o < 5 CTCs/7.5mL) demostró ser superior al descenso del PSA para predecir supervivencia, sobre todo en los momentos más iniciales. Así, a las 12 semanas de seguimiento, las curvas ROC demostraron una superioridad significativa de las CTCs sobre el descenso del 30% del PSA, para predecir la muerte del paciente a los 12 meses (*area under the curve AUC* de 81.5% vs 67.5%,

respectivamente) (84). Adicionalmente, en un análisis posterior, se valoró la capacidad de las CTCs como variable continua, para predecir supervivencia global antes de iniciar el tratamiento. El análisis multivariante solo las CTCs y la LDH fueron predictores independientes de supervivencia de forma estadísticamente significativa, hecho que no se pudo demostrar para el PSA (98).

Sin embargo, estos nos son los únicos puntos de corte que se han propuesto y no parece que sea sencillo establecerlos. En un estudio del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) se analizó una cohorte de 99 pacientes con CPRCm y se observó que existía una fuerte correlación entre CTCs y supervivencia pero no se observó un efecto umbral. Los recuentos basales de CTCs se relacionaron de forma modesta con otros indicadores clásicos como el PSA o la gammagrafía ósea (99). Por otro lado, el Royal Marsden realizó otro estudio en 119 pacientes CPRCm y estableció tres grupos pronósticos de supervivencia (<5CTC/7.5mL, 5-50 CTCs/7.5mL y >50 CTCs/7.5mL). En este último, un descenso del 30% en el número de CTCs tras el inicio de tratamiento, se asoció a una mejor supervivencia global. También se observó que la enumeración basal de CTCs se correlacionó con otros factores pronósticos conocidos como PSA, LDH, fosfatasa alcalina, presencia de metástasis o las cifras de hemoglobina (100).

El también famoso ensayo clínico fase III COU-AA-301 validó los resultados del IMMC38 de forma prospectiva. Este ensayo comparó dos brazos de tratamiento: abiraterona vs placebo en pacientes con CPRCm tras quimioterapia, y demostró que la conversión de desfavorable (> 5 CTCs) a favorable (< 5 CTCs) a las 4 semanas de tratamiento era un factor predictivo de mejor supervivencia. En el análisis multivariante, el conteo de CTCs redujo significativamente (101).

- **CTCs como marcadores subrogados o sustitutos**

En primer lugar, conviene aclarar la diferencia entre biomarcador y marcador subrogado.

- **Biomarcador**: se define clásicamente como una medida de laboratorio que refleja la actividad de una enfermedad. El PSA es el biomarcador clásico del cáncer de próstata. En prácticamente todos los casos, estos biomarcadores cuantitativamente se correlacionan (ya sea directamente o inversamente) con la progresión de la enfermedad.

- **Marcador subrogado, sustituto o indirecto**: se define como una medida de laboratorio utilizada en los ensayos clínicos como sustituto de un criterio o endpoint clínicamente significativo que refleja de forma directa cómo un paciente funciona o sobrevive (p.e supervivencia global), y que se espera sea capaz de predecir el efecto de la terapia.

La diferencia principal entre un biomarcador y un marcador sustituto es que un biomarcador es un marcador sustituto “en potencia”, mientras que un marcador sustituto constituye una prueba validada de la medida de los efectos de un tratamiento específico.

La importancia de los marcadores sustitutos radica en que permiten el estudio de los efectos de un nuevo fármaco de forma mucho más rápida, sin tener que esperar a que se produzca el end-point principal, que suele ser la supervivencia global.

Sobre la base de los resultados del COU-301, se han desarrollado y evaluado modelos para evaluar la respuesta de las CTCs como marcadores subrogados o sustitutos de supervivencia. No obstante, el grado en que la respuesta del marcador capta realmente el efecto del tratamiento sobre la supervivencia se debe demostrar utilizando los criterios Prentice (102).

Los criterios Prentice requieren que:

- el biomarcador se evalúe en terapias que proporcionen beneficios de supervivencia.
- el tratamiento tenga un efecto sobre el biomarcador propuesto.
- el biomarcador tenga un efecto sobre el punto final clínico.
- el efecto del tratamiento (endpoint) sea captado por el biomarcador.

Para calificar a las CTCs como **marcador subrogado o sustituto** de supervivencia en cáncer de próstata, es decir, como un sustituto aceptado para la aprobación de nuevos fármacos, estos criterios deben demostrarse en distintos ensayos prospectivos amplios, y posteriormente un metaanálisis debe corroborarlo, tanto a nivel del ensayo como a nivel individual.

El modelo dicotómico de CTCs $< 5\text{CTC}/7.5\text{mL}$ vs $> 5\text{CTC}/7.5\text{mL}$ a las 12 semanas de tratamiento, discutido anteriormente, cumple todos los criterios Prentice a nivel individual. Sin embargo, para demostrar que esto constituye efectivamente un marcador subrogado de supervivencia es preciso volver a demostrarlo en nuevos ensayos clínicos más amplios (103). Si eso es así, las CTCs podrían convertirse en un marcador sustituto de supervivencia, facilitando la aprobación de nuevos fármacos en base a los cambios de las CTCs a las 12 semanas de tratamiento. Esto incrementaría la eficiencia y reduciría los costes de los ensayos de nuevos tratamientos. De la misma forma, eliminaría el sesgo de la supervivencia global que generan los tratamientos post-ensayo de los pacientes.

✓ *Caracterización biológica de las CTCs*

Recientemente, existe un interés exponencial en conocer al detalle la maquinaria interna (biología molecular) de las CTCs. La investigación cualitativa o fenotípica de las CTCs a nivel genómico y/o proteómico es imprescindible para conocer con exactitud los mecanismos biomoleculares que hay detrás de la enfermedad metastásica. Las CTCs constituyen una genial fuente de información para comenzar a desenmarañar la biología del proceso metastásico y la sistematización de este conocimiento podría ser de ayuda para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes a nivel individual. Este es el verdadero objetivo de la “biopsia líquida”: conocer el estado oncológico individual y a tiempo real del paciente.

La adecuada caracterización de las CTCs permitiría estudiar de forma simultánea:

1.- La **evolución temporal del tumor** y **respuesta inducida** por el tratamiento.

2.- La **heterogeneidad clonal intratumoral**

Existen multitud de test genómicos y proteómicos que se pueden realizar sobre estas células (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de copias de genes mediante hibridación genómica comparativa (aCGH), análisis de secuencia genómica o estudios epigenéticos). Actualmente la técnica más empleada para el estudio cualitativo de CTCs es el **inmunofenotipado**, en el cual está también basada la enumeración de CTCs (anti-EpCAM, DAPI, anticuerpos anticitoqueratinas, etc). La principal limitación de este tipo de tests es el solapamiento de los anticuerpos necesarios para marcar las células.

En el caso del CaP, distintos test citogenéticos basados en la hibridación fluorescente in situ (**FISH**), permiten detectar en las CTCs la presencia o ausencia (heterocigoto o homocigoto) de **PTEN**, valorar el número de copias del gen del receptor de andrógenos (RA), o valorar la presencia de traslocaciones del ERG. La inmunofluorescencia con

distintos colores permite estudiar todos estos genes a la vez, permitiendo dar un perfil de expresión a las distintas CTCs. Este análisis ha demostrado tener aplicación pronóstica y predictiva en pacientes con CPRCm sometidos a tratamiento con abiraterona (104). La valoración del gen del RA mediante FISH se puede complementar con la detección de mutaciones de ADN en las CTCs (105). En el caso de la importante vía de señalización del PTEN, se puede complementar su valoración funcional mediante la detección de mutaciones “*hotspot*”, dirigiendo los anticuerpos a la secuencia genética **PI3K/AKT** circulante (106).

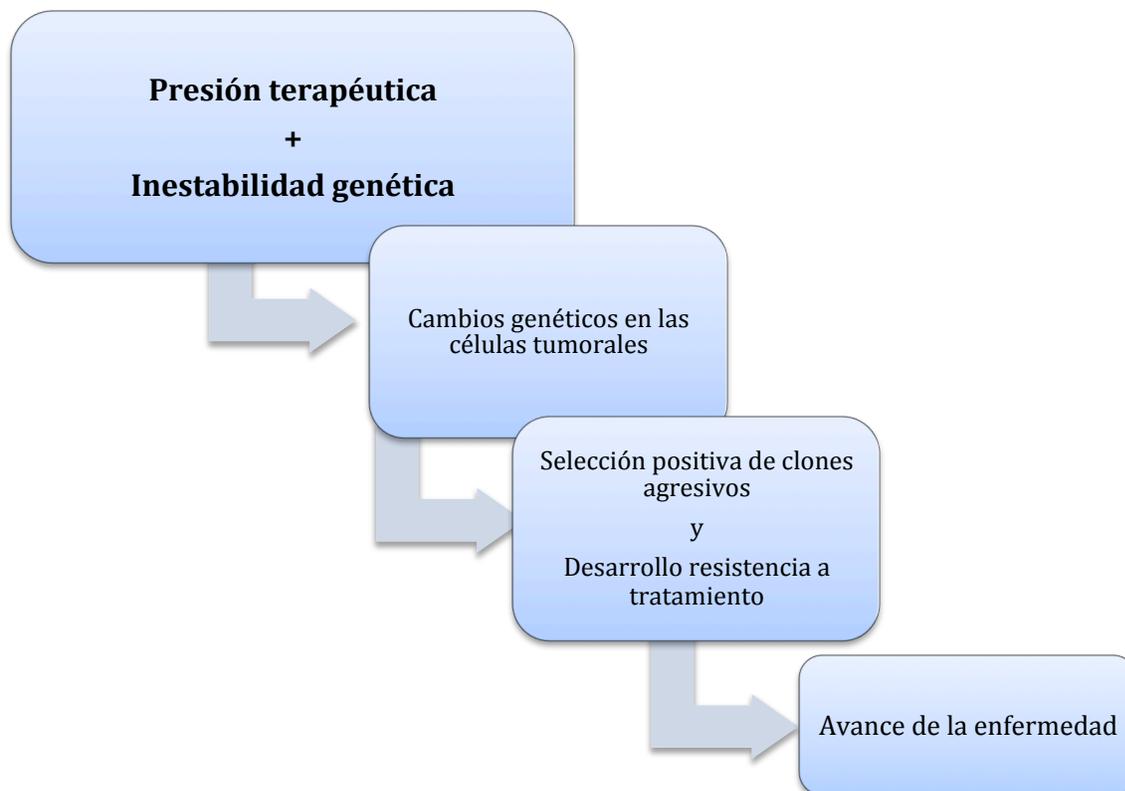
La **detección de mutaciones en el EGFR** dentro de las CTCs ha servido, en otros tumores, para estudiar los mecanismos de resistencia a los tratamientos con inhibidores del EGFR. Por eso, con el advenimiento de las nuevas técnicas de secuenciación de última generación de ADN y ARN circulantes, y con la posibilidad actual real de amplificar el genoma completo celular, es fácil prever que las CTCs representarán una fuente idónea para el análisis genómico y transcriptómico tumoral a través de una simple muestra de sangre periférica. Además, el ADN de las CTCs puede utilizarse incluso para estudios epigenéticos, como el análisis de metilación (107).

La **heterogeneidad** en el cáncer no es un concepto nuevo y se conoce de largo, sin embargo las técnicas de poder estudiarla en detalle han explotado recientemente. La heterogeneidad tumoral ocurre a distintos niveles: intra e intertumoral, intra e inter paciente, a lo largo de la historia natural de la enfermedad neoplásica e incluso dentro de una misma lesión tumoral pueden coexistir distintos clones celulares con diferencias muy significativas en su expresión genética.

Recientemente, un estudio de Wyatt y cols. (108) comparó la expresión genética en muestras de tejido tumoral y en ctDNA circulante de pacientes con CPRC. Los autores observaron que existían pacientes en los que la genética del tejido concordaba con la genética de la sangre, sin embargo existía otro grupo de pacientes en los que no se daba esta concordancia.

Un enfoque más novedoso es el propuesto por algunos autores, que optan por estudiar la **heterogeneidad tumoral global** de un paciente de forma individual, más que investigar las mutaciones o alteraciones de forma específica, para así clasificar a los pacientes en grupos de riesgo. Scher y otros autores demostraron como utilizando el **índice de Shannon** (109) se podía obtener un valor cuantificable de la heterogeneidad tumoral en un individuo, a partir de la heterogeneidad morfológica de las CTCs. Utilizando este planteamiento, fueron capaces de demostrar que la heterogeneidad de las CTCs se asocia a peores resultados clínicos en pacientes con cáncer de próstata (110,111).

Se ha propuesto que la heterogeneidad tumoral sea una consecuencia de la presión terapéutica sobre el tumor. Según esta hipótesis, la demostrada **inestabilidad genómica** tumoral, sometida a una **presión terapéutica selectiva**, favorecería una selección y diversificación de clones tumorales, responsables de la heterogeneidad, responsable a su vez de la aparición de resistencias al tratamiento y del avance de la enfermedad (esquema).



Aunque los biomarcadores circulantes, como las CTCs o el ctDNA, hicieron su aparición hace más de 10 años y consiguieron demostrar que son un marcador pronóstico y predictivo fiable, no han conseguido todavía hacerse un hueco en la práctica clínica habitual. Probablemente esto sea debido a la desbordante y heterogénea cantidad de información disponible. Resulta muy complejo reproducir de los resultados de los distintos estudios, e igualmente difícil compararlos sistemáticamente, para poder llegar a conclusiones de impacto clínico claro y reproducible. Por ello, es necesario el consenso y la unificación de criterios. En este sentido, la aparición de Sociedades como la SIBL y la promoción de encuentros de consenso específicos (workshops) que faciliten el co-working y la investigación colaborativa, resultan de enorme importancia.

A modo de ejemplo, recientemente se publicaron unas recomendaciones de consenso creadas a partir de un encuentro (**Workshop**) de investigadores y clínicos especializados en biopsia líquida, durante el **Canadian Cancer Trial Group (CCTG) Spring Meeting** en Abril de 2016 (112). Durante el mismo, se revisaron las últimas tecnologías de detección y los resultados traslacionales más relevantes concernientes a las CTCs y el ctDNA. Dado el interés de sus conclusiones, hemos decidido resumirlas en el siguiente cuadro:

Consideraciones de consenso del *Canadian Cancer Trial Group (CCTG)* para la incorporación de las CTCs y el ctDNA en Ensayos Clínicos. Adaptado de *Lowes LE, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) Workshop 2016: Scientific Opportunities and logistics for cancer Clinical Trials incorporation. Int J Mol Sci. 2016, 17, 1505.*

1.- Los ensayos clínicos deben de diseñarse basándose en **criterios clínicos relevantes** y no en criterios de biomarcadores. Los biomarcadores deben considerarse solo como una herramienta adicional a la información pronóstica y predictiva que ya haya sido previamente validada.

2.- Los ensayos clínicos deben realizarse en un **escenario clínico concreto y definido**, con herramientas diagnósticas y terapéuticas validadas, donde se pueda valorar el valor añadido de estos biomarcadores en términos de beneficio para el paciente.

3.- El diseño de los estudios debe considerar la **afectación del tratamiento sobre el biomarcador**. Es posible, que la acción terapéutica influya sobre la carga de biomarcador, lo cual puede complicar o sesgar su valoración.

4.- Es necesario el diseño, implementación y validación de procedimientos estandarizados de recogida y análisis de muestras (<i>Standard Operating Procedures o SOPs</i>).
5.- Se debe establecer de forma apropiada el momento de la recogida de muestras (timing), el cual debe estar basado en las características de la enfermedad y escenario clínico (antes del tratamiento, durante, después).
6.- Se debe establecer previamente si se va a realizar solo enumeración o va a ser necesaria la caracterización . Así mismo establecer a qué nivel se va a realizar la caracterización (ADN, ARN, proteínas, funcional) con el objetivo de responder a una pregunta concreta.
7.- Selección apropiada de la metodología de detección a emplear . Reparando de forma especial en la reproducibilidad y el coste del estudio.
8.- Análisis estadístico adecuado . Selección adecuada del número de pacientes para poder responder a una pregunta concreta. Dada la heterogeneidad tumoral y el comportamiento de estos biomarcadores, será necesario un mayor número de pacientes que en otros tipos de estudios.
9.- Analizar e interpretar los datos de forma adecuada, sobre todo tratando de establecer comparativas con estudios previos, para lo cual es imprescindible seguir las recomendaciones anteriores.

Conclusiones:

El estudio minucioso de la biología molecular de las CTCs puede ayudar a entender mejor el proceso metastásico y facilitar el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Sus aplicaciones en el ámbito de la investigación clínica y básica son múltiples:

a.- Valor **pronóstico** para la estratificación de pacientes en los ensayos clínicos.

b.- Valor **predictivo** como marcadores de respuesta a tratamiento y para la toma de decisiones clínicas. Su capacidad para detectar de forma temprana, y antes que los test convencionales (PSA, gammagrafía, TAC) la respuesta a un tratamiento, permitiría ahorrar costes innecesarios y evitar la administración de fármacos caros y tóxicos, eligiendo la mejor opción en cada caso.

c.- Valor como **marcador sustituto** de supervivencia, lo cual podría acelerar la aprobación de fármacos.

✓ *Importancia del EGFR en CaP.*

Biología molecular del EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico o *epidermal growth factor receptor* (**EGFR**, o también conocido como **HER-1**) fue el primero de los receptores de la familia HER descubierto. En condiciones fisiológicas, el EGFR se expresa en multitud de células epiteliales (piel, hepatocitos o vejiga entre otras). De la misma manera, el EGFR se sobreexpresa en distintos cánceres (próstata, pulmón, cabeza y cuello, colon, vejiga o riñón) (113).

El EGFR constituye una molécula clave para poder entender el desarrollo farmacológico de los últimos 20 años en la oncología general. Por ello, es interesante conocerlo en detalle. Molecularmente, es un **receptor tirosín quinasa** que juega un papel central en la transducción de señales relacionadas con la **supervivencia y la proliferación celular**. Existen distintos factores de crecimiento que pueden activar las señalizaciones controladas por el EGFR. Entre ellos, los más importantes son dos: el propio factor de crecimiento epidérmico (**EGF**) y el factor de crecimiento tumoral alfa (**TGF α**). Al activar al EGFR se consigue la dimerización o heterodimerización con otros receptores de la familia HER (fundamentalmente con el **HER-2**). Posteriormente se produce la cascada de activación de la tirosín quinasa y se reclutan distintos efectores celulares que generan la activación de distintas vías de proliferación y supervivencia celular.

A día de hoy, existen fundamentalmente dos modalidades de terapias diana (*targeted therapies*) oncológicas frente al EGFR: **Anticuerpos monoclonales** (*monoclonal antibodies*, fármacos terminados en **-mab**) e **inhibidores de la tirosín quinasa** (**TKI**, fármacos normalmente terminados en **-ib**). Los más utilizados son: includecetuximab (Erbix®), gefitinib (Iressa®) y erlotinib (Tarceva®).

Los monoclonales y los TKI difieren claramente de su mecanismo de acción sobre su diana, en este caso el EGFR. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden

comportarse como agonistas o antagonistas, competitivos o no, al unirse a la porción extracelular del receptor. Sin embargo, los TKI actúan sobre la porción intracelular del receptor, compitiendo con el ATP para inhibir la fosforilación de la secuencia tirosín quinasa. Dependiendo del TKI esta inhibición puede ser reversible (gefitinib and erlotinib) o irreversible (PD-183805). Otra diferencia con los monoclonales, es que los TKI no son estrictamente específicos para su receptor. Como ejemplo, en el caso del EGFR, los TKI pueden tener actividad cruzada con otros receptores similares de la misma familia, como el HER-2.

A nivel biomolecular, el **bloqueo del EGFR** ha demostrado alterar varios fenómenos celulares: **proliferación, apoptosis y angiogénesis**. En diversos experimentos en laboratorio se ha observado que cuando se bloquean los EGFRs se produce un enlentecimiento de la división celular al bloquear las células en fase G1 (114). Además, se produce un desequilibrio en los niveles celulares de Bax y Bcl-2, lo cual sustenta el efecto proapoptótico que se consigue al inactivar este receptor. Su efecto antiangiogénico queda patente cuando se observa que al bloquear el EGFR se produce una inhibición de la secreción de factores proangiogénicos (VEGF y factor VIII) por parte del tejido tumoral.

También desde un punto de vista clínico, en cáncer de pulmón se ha observado que algunos TKI son más efectivos en pacientes con determinadas **mutaciones del EGFR** (115), lo cual abre nuevas líneas de investigación para la medicina personalizada con este tipo de fármacos sobre esta diana en concreto.

EGFR y CaP.

La vía del EGFR se ha estudiado bastante en el cáncer de próstata. De hecho, algunos de los mecanismos de hormonoresistencia están asociados a esta familia de receptores (HER).

A nivel práctico, un interesante estudio de Schlomm y cols (116), analizó 2497 muestras de tejido con cáncer de próstata y demostró que el 18% de los casos expresaban EGFR, lo cual se asoció a un mayor grado histológico y mayor riesgo de recidiva bioquímica en el análisis univariante. Además, en el análisis multivariante, la expresión de EGFR fue un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión. Y no solo eso, sino que casi la totalidad de las metástasis de los pacientes con CPRCm expresaban EGFR, lo cual sugería que este receptor juega un papel primordial en la **diseminación de la enfermedad**.

Un reciente estudio comparó la expresión y **mutación del EGFR** entre pacientes con cáncer de próstata **hormonosensible vs hormonoresistente** (117). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la presencia de mutaciones del EGFR, sin embargo, el tiempo hasta la progresión a CPRC fue más corto para los pacientes con una sola mutación del EGFR. No obstante, el tamaño muestral (10 pacientes en cada grupo) fue muy bajo como para obtener conclusiones.

Algunos **mecanismos involucrados en la vascularización** de la próstata podrían estar implicados en la progresión a la **homonoresistencia** del cáncer de próstata. Otro reciente estudio trató de demostrar cual era el mecanismo exacto de acción de los antiangiogénicos. Para comparar el efecto de los antiangiogénicos y el efecto de la castración utilizaron líneas celulares de cáncer de próstata independiente a andrógenos (AT-1) (a priori no respondedoras a la castración) que se implantaron en la próstata de ratas, las cuales fueron tratadas con castración vs un inhibidor común de VEGFR 2 y EGFR (ZD6474, Zactima™, Astra Zeneca). Con este modelo, el efecto de la castración sería solo patente en las células normales y no en las células AT-1, mientras que el efecto del TKI

sería patente en ambas células. Ambos tratamientos demostraron una disminución de la densidad vascular en el tejido (en el caso de la castración en el tejido normal circundante al tumor, y en el caso del TKI en el propio tejido tumoral) provocando una hipoxia, apoptosis y disminución del crecimiento tumoral de forma conjunta. Estos hallazgos sugieren que tanto la castración como los TKI tienen mecanismos de acción antitumoral similares. Además, se observó que el tratamiento combinado con ambos fármacos era más efectivo en generar hipoxia tumoral que la castración sola o el TKI solo. Por ello, concluyen que el **tratamiento combinado** con estos agentes (castración + ZD6474) podría ser beneficioso en pacientes con cáncer de próstata (118).

De forma similar, el equipo de Guerin y cols (119) comparó, también en condiciones de laboratorio con animales, la actividad de sunitinib (TKI antiangiogénico), cetuximab (monoclonal anti-EGFR) y docetaxel. Cada uno de estos fármacos resultó tener una actividad similar respecto a la inhibición del crecimiento tumoral (inhibición del 50% del crecimiento a las 3 semanas, reducción de la proliferación celular (Ki67) y reducción de la angiogénesis (factor de Von Willebrand). Además, observaron que la **combinación** de sunitinib-cetuximab-docetaxel tenía un efecto antiapoptótico mayor que cualquiera de las otras combinaciones. Como veremos a continuación, la investigación actual se dirige a una estrategia farmacológica basada en la **inhibición de múltiples formas del EGFR** que pudiera ser beneficiosa para los pacientes con CaP avanzado.

Ensayos clínicos con inhibidores del EGFR en CaP.

En base a esta evidencia a nivel de laboratorio, se han realizado distintos ensayos para probar la efectividad clínica de los inhibidores del EGFR, tanto en monoterapia como en combinación, en situaciones reales. Los resultados hasta ahora, sin embargo, no han sido demasiado alentadores. Repasaremos algunos de los más significativos.

En un ensayo clínico fase II con **erlotinib** sobre 29 pacientes con CPRC tras quimioterapia (120), se observó que solo el 14% de los pacientes consiguieron una

estabilización del PSA. Los pacientes recibieron 150mg/día de erlotinib durante el primer mes y, si la tolerancia era buena, subían a 200mg/día. La toxicidad en términos generales fue moderada. Del mismo modo, otro ensayo fase II, esta vez con **gefitinib** sobre 100 pacientes con CPRC, tampoco logró demostrar respuestas clínicas significativas.

Si a nivel de laboratorio tenían un gran potencial y en otros tumores han demostrado su efectividad, **¿por qué no funcionan estos fármacos en el CaP?**.

Probablemente sea debido a la existencia de otras vías paralelas. Se ha observado que la cascada de la tirosín quinasa no es el único mecanismo de acción del EGFR. De este modo, la **hiperactividad de la vía del PI3K/Akt** o la **estabilización del receptor SGLT** (un EGFR tirosín quinasa independiente que participa en la estabilidad y supervivencia celular) (120) en las células tumorales del CaP se han propuesto como posibles explicaciones a esta falta de actividad clínica de los inhibidores del TKI en el CaP.

Por ello, los **tratamientos combinados sobre distintos mecanismos del EGFR** han ido ganando más interés, aunque hasta la fecha se han realizado muy pocos ensayos y sin demasiado éxito. A modo informativo resumimos a continuación, muy brevemente, algunos de estos ensayos.

Dado que el docetaxel es un tratamiento estándar en el CPRCm, ha sido con este fármaco con el cual se han realizado los primeros intentos de combinación. Así, Chiorean y cols (121), realizaron un ensayo fase II probando la combinación de docetaxel (30mg/semanal) + erlotinib (150mg/día) con el objetivo de valorar la posibilidad de reducir la dosis de docetaxel en estos pacientes. Aunque el reclutamiento fue muy escaso, observaron respuestas significativas en los pacientes.

En otro ensayo fase II multicéntrico se reclutaron 22 pacientes con CPRC mayores de 65 años y se sometieron a terapia de docetaxel + erlotinib (122). No se evidenciaron respuestas clínicas significativas más allá de una reducción del 50% del PSA en algunos

pacientes, además acompañados de considerables efectos adversos, por lo que se concluyó que esta combinación no parecía tener un beneficio clínico claro.

En un estudio fase II más amplio, sobre 86 pacientes con CRPCm, se estudió la efectividad de vandetanib (100mg/día) + docetaxel (75mg bisemanal) + prednisolona (10m/día) vs placebo + docetaxel (75mg bisemanal) + prednisolona (10m/día). En la misma línea de los estudios previos, los resultados de este ensayo mostraron mayores tasas de progresión de enfermedad o muerte en el brazo de vandetanib (65% vs. 60%, HR = 1.13, p = 0.67) con tasas de efectos adversos similares en ambos grupos. Por tanto, se concluyó que la combinación de este TKI con docetaxel no aportaba tampoco beneficio clínico alguno.

Como vemos, estos intentos de combinación han tenido solo en cuenta al docetaxel como terapia central. La realidad terapéutica del cáncer de próstata cambia muy rápido y no se ha probado aún a combinar los inhibidores del EGFR con las nuevas y más potentes moléculas antiandrógenos (abiraterona, enzalutamida). En el futuro, ésta puede ser una nueva línea de investigación clínica.

Conclusiones:

El EGFR constituye una diana terapéutica lógica en CaP, ya que **los receptores de la familia HER están con frecuencia hiperactivos en esta enfermedad** y participan en la proliferación, neoangiogénesis e invasión celular.

A nivel clínico, los inhibidores del EGFR han demostrado su efectividad en otros tumores. Sin embargo, aunque los estudios preclínicos fueron prometedores, **los ensayos clínicos no han conseguido demostrar claramente su efectividad en el CaP** avanzado. Probablemente, el futuro pase por los ensayos en combinación con otros fármacos (multi-TKIs, docetaxel, abiraterona, enzalutamida) que quizás puedan arrojar nuevas evidencias en términos de supervivencia y, sobre todo, en términos de calidad de vida, que debe ser el end-point fundamental en esta población de pacientes.

✓ ***Receptor de andrógenos en CaP.***

El receptor de andrógenos (RA) juega un papel primordial en la aparición, desarrollo y progresión del cáncer de próstata. En este capítulo describiremos la evidencia actual acerca del papel de este receptor en la células del CaP, así como el pasado, presente y futuro de este receptor como diana terapéutica en esta enfermedad.

El RA es un miembro de la superfamilia de **receptores intranucleares**, el cual es activado por sus ligandos (andrógenos) para regular la expresión de su gen diana (gen del RA). Se sabe que el RA participa y regula distintos mecanismos de **proliferación**, pero también de **muerte** celular.

- **RA y mecanismos de proliferación celular:**

El conocido estudio de Huggins (123), el cual le valió el premio Nobel, fue el primero en demostrar el papel clave del RA en el desarrollo del CaP. Tras publicar sus resultados, la castración química se convirtió en el estándar de tratamiento de esta neoplasia. Sin embargo, se fue observando que un alto porcentaje de pacientes terminaban presentando resistencias a la terapia de deprivación androgénica (TDA), y pasaban a un estadio final y diferenciado de la enfermedad que hoy se conoce como “cáncer de próstata resistente a castración” (CPRC).

En un principio, se le atribuyó al RA la sola capacidad de favorecer la proliferación celular en el CaP. No obstante, con el paso del tiempo, se descubrió que el RA podía también regular negativamente el crecimiento de este tumor, en función del tipo de células que lo componían y del microambiente al que éstas estuviesen sometidas (124).

Y es que se sabe que el CaP es una **mezcla de células en distintos estadios de diferenciación**. Estas células podrían derivar de células madre progenitoras de CaP que serían **CK5+**, **CK8-** y **RA-**.

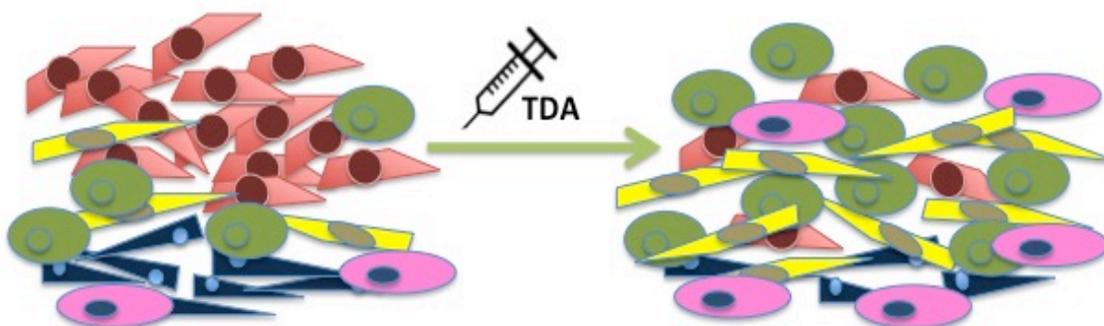
Para entender este proyecto de tesis creemos imprescindible explicar este concepto algo más en detalle.

En el tejido próstático normal existen 3 tipos de células epiteliales (figura 8):

1.- Células luminales CK5-/CK8+

2.- Células intermedias CK5+/CK8+

3.- Células basales CK5+/CK8-



Tipo célula	Marcador	Papel del RA en su crecimiento	Respuesta tras la TDA
Células luminales 	CK5-, CK8+, RA+	Estimula	Disminuye
Células intermedias 	CK5+, CK8+ RA-	Inhibe	Aumenta
Células basales 	CK5+, CK8-, RA-	Inhibe	Aumenta
Célula progenitora (stem cell) 	CD133, CK5+, CK8-, RA-	Inhibe	Aumenta
Células estromales (músc. liso, fibroblastos) 	vimentina calponina	Estimula	Disminuye

Figura 8: El RA puede facilitar la supresión o el crecimiento del CaP dependiendo de las células predominantes. Igualmente, la privación androgénica puede producir diferentes resultados según el tipo celular individual. **TDA**: Terapia de privación androgénica. Adaptado de *Weng et al. Cancer Treat Rev. 2014 February; 40(1). doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.008 (125).*

Las células madre progenitoras del cáncer de próstata CK5+/CK8-/AR- son capaces de diferenciarse a células basales intermedias (CK5+/CK8+) y luminales (CK5-/CK8+) (126). Ya en 1994, Bonkhoff y cols (127) demostraron que **la privación androgénica solo era capaz de eliminar la mayoría de las células luminales (CK5-/CK8+/RA positivas)**, mientras que la mayoría de las células basales permanecían indemnes. Según este modelo, la TDA actual eliminaría solamente las células luminales, pero favorecería que las células madre generaran nuevas células basales e intermedias provocando el estado de resistencia a la castración.

En condiciones experimentales de laboratorio y con modelos animales, se han estudiado todos estos tipos celulares y se han sometido a) predominantes en cada paciente. De este modo, parece demostrado que en líneas generales **el RA inhibiría el crecimiento de las células progenitoras, basales e intermedias (CK5+), y por el contrario, estimularía el crecimiento de las células luminales (CK5-/CK8+)**.

- **RA y mecanismos de muerte celular:**

En el tejido prostático normal, el mantenimiento de la homeostasis celular y la estabilidad de los mecanismos de muerte celular son cruciales para evitar el desarrollo tumoral. Pues bien, estudios recientes han observado que el RA juega un papel determinante en la regulación de este equilibrio (128, 129). Existen distintos mecanismos de muerte celular (apoptosis, anoikis, entosis, necrosis, autofagia).

Al igual que sobre los mecanismos de proliferación celular, el RA parece también jugar un **papel ambiguo** en la muerte celular. El RA es capaz de inhibir la apoptosis, necrosis y autofagia, pero a la vez es capaz de favorecer la apoptosis, anoikis y la entosis. Aclaremos los términos:

- **Apoptosis, necrosis, autofagia:** mecanismos de muerte celular con una acción reguladora predominante sobre el mantenimiento del número de células en el tumor (**crecimiento tumoral**).

- **Anoikis, entosis:** mecanismos de muerte celular (inducidos por desintegración de matriz extracelular, o *ECM*) con una acción reguladora predominante sobre la *EMT* y, por tanto, el desarrollo de **metástasis**.

Muchos estudios demuestran que, mientras que la apoptosis, necrosis y autofagia están relacionados con el crecimiento tumoral; la anoikis y la entosis parecen más relacionados con las metástasis. Estos hallazgos son muy interesantes pues están en línea con la hipótesis de que el RA tenga una actividad positiva muy activa en el crecimiento y proliferación del cáncer de próstata, mientras que juega un papel negativo en el desarrollo de las metástasis (125). De esta manera, en la mayoría de CaP hormonosensibles, el RA favorecería el crecimiento tumoral y por tanto, su supresión generaría una adecuada respuesta al tratamiento. Sin embargo, en algunos casos de CaP hormonorresistente, el RA funcionaría como promotor de la apoptosis, y su supresión explicaría parte de los fallos terapéuticos y progresiones que se observan con la TDA actual.

En resumen, el desarrollo, crecimiento y progresión del CaP no depende de forma mayoritaria de ninguno de los mecanismos de proliferación o de muerte celular descritos previamente. Lo que queda claro es que **el RA puede funcionar en uno o en otro sentido dependiendo de las señales, receptores y células sobre las que actúa. Eso explicaría la efectividad inicial pero posterior resistencia a la TDA.** Por tanto, un conocimiento al detalle de su funcionamiento puede ayudar a resolver las incógnitas que aún quedan respecto a la deprivación androgénica en esta enfermedad.

Perspectivas de futuro:

Bajo esta hipótesis y modelo de probable funcionamiento del RA, es tentador inferir que quizás la aplicación de TDA, administrada de forma única, en los estadios finales de la enfermedad pueda llegar a ser incluso contraproducente. Algunos autores incluso se atreven a sugerir que la deprivación androgénica, de la forma que se administra actualmente, podría favorecer la progresión metastásica en determinados pacientes a través de los mecanismos antes citados (125). Por ello, parece justificado, investigar **tratamientos combinados** junto

a la deprivación androgénica, capaces de eliminar las células que la deprivación estimula a través de la anoikis y la entosis (**TDA + agentes pro-anoikis y/o pro-entosis**).

Para buscar potenciales fármacos que hagan que esta combinación sea efectiva es necesario conocer al detalle las potenciales dianas del proceso de anoikis y de entosis.

Muy brevemente. Probablemente, el RA estimula la anoikis a través de la supresión del p38 (130). Por tanto, estimuladores del p38 constituirían una potencial combinación con la supresión androgénica. Con este objetivo, se ha propuesto a la **platicodina D**, un inductor del p38 que se ha utilizado para estimular la anoikis en otros tipos de cánceres (131) y que podría convertirse en un potencial candidato a combinar con TDA.

Respecto a la entosis parece demostrado que se produce, en gran medida, a través de la estimulación de la vía del RhoA/ROCK por parte del RA. Por tanto, un activador de esta vía, el **RhoGEF2**, podría igualmente ser considerado para su combinación con TDA (132).

- **RA y CTCs:**

Dada su versatilidad y capacidad de cambio durante el desarrollo y progresión del cáncer de próstata, como hemos visto anteriormente, la detección y correcta caracterización del RA en las células circulantes del tumor puede suponer un gran avance para el conocimiento a tiempo real de la enfermedad, y así poder optimizar el tratamiento que más conviene en cada momento.

En este capítulo resumiremos la evidencia actual, desde una perspectiva más traslacional, acerca de la detección de RA en las CTCs.

Hasta donde sabemos, salvo el nuestro, ningún estudio ha evaluado la presencia de RA en las CTCs de pacientes con cáncer de próstata localizado, y toda la evidencia actual está referida a pacientes metastásicos o CPRCm.

Un reciente e interesante trabajo de Crespo et al. (133) estudió la expresión de RA en 94 muestras de CTCs procedentes de 48 pacientes con CPRCm tratados con abiraterona

y enzalutamida. La metodología empleada para la detección de CTCs fue el CellSearch, seguido de un algoritmo automático de identificación y cuantificación del RA en las células. Sus resultados más destacados podrían resumirse en dos ideas principales:

- Gran **heterogeneidad “intra e inter paciente”**. La expresión de RA fue muy diferente tanto entre las CTCs de un mismo paciente de forma individual como entre las CTCs de distintos pacientes, sin encontrar diferencias significativas. Este hecho está en línea con todo lo expuesto anteriormente. El RA tiene un mecanismo de acción complejo y se expresa de forma desigual dependiendo del tipo de célula y microambiente en el que se encuentra.

- El **tratamiento previo** con abiraterona o enzalutamida **no modificó la expresión del RA en las CTCs**. Mutaciones no detectadas del RA podrían ser la explicación a este hecho. La metodología empleada utilizó un anticuerpo sobre el extremo aminoterminal del RA, el cual no es capaz de discriminar entre el RA completo o las variantes splice mutadas, causantes de la resistencia a estos fármacos (134).

Además, en algunos pacientes detectaron manualmente **CTCs AR+/CK-**. Estas células normalmente se perderían o no se analizarían con el sistema de detección CellSearch (basado en las CKs). Si bien, estos resultados podrían corresponderse con un problema técnico de detección de las CK, también podrían corresponderse con una expresión del proceso de EMT (pérdida de CKs), asociada al proceso metastásico.

Por todo ello, son necesarios estudios en series de pacientes mucho más amplias y optimizar la metodología de detección (incluir variantes mutadas del RA) para esclarecer los posibles cambios del RA en las CTCs en estos pacientes.

A.3.2.2.- ADN libre circulante (*cell-free tumor DNA o ctDNA*)

Como vimos anteriormente, el término *biopsia líquida* incluye también el análisis de ácidos nucleicos libres en sangre, como es el ctDNA. Al igual que un tumor es capaz de liberar al torrente sanguíneo células (CTCs), **la necrosis y apoptosis de las células tumorales**, tanto del tumor primario como de sus metástasis, pueden también liberar a sangre fragmentos de ctDNA, susceptibles de ser detectados con la tecnología actual.

Existe actualmente un debate (probablemente, de carácter únicamente comercial) que trata de ver a las CTCs y el ctDNA como competidores, luchando por ver cual de los dos es capaz de aportar una información clínica más útil. No obstante, la información de CTCs y ctDNA es distinta y es por tanto probable, que sea la correcta comprensión y **conjunción** de ambas fuentes la que más utilidad aporte.

El cfDNA ha sido la piedra angular del diagnóstico prenatal desde hace muchos años, sin embargo ha estado infrutilizado e infravalorado en el terreno oncológico, debido principalmente a cuestiones técnicas en su detección. De la experiencia en diagnóstico prenatal, es precisamente de donde se conocen muchas de sus propiedades biológicas. Si la vida media de las CTCs es corta (de 1 a 2.4 horas) la **vida media** del cfDNA y, consecuentemente del ctDNA, es aún más corta (**16 minutos**) (135). Se elimina a través del hígado y los riñones. Se estima que el cfDNA está constituido por fragmentos de unas **140-180 pares de bases**, procedentes del ADN protegido del nucleosoma. En sangre, el cfDNA se encontraría en concentraciones de **0 a 50 ng/mL**.

Como vemos, a la hora de hablar de **DNA libre en sangre**, conviene diferenciar dos conceptos similares que pueden llevar a confusión: cell-free tumoral DNA (**ct-DNA**) vs cell-free DNA (**cf-DNA**).

ct-DNA	son fragmentos de ADN liberados a sangre por la necrosis y apoptosis de células tumorales.
cf-DNA	son fragmentos de ADN liberados a sangre por la necrosis y apoptosis de células NO tumorales.

Se estima que la fracción de ADN libre correspondiente específicamente a ctDNA (ADN tumoral) constituye solo el **0.1%-10% de todos los ácidos nucleicos libres en sangre** (cfDNA) (136). Por tanto, es fácil inferir que los fragmentos de cfDNA pueden dificultar la detección del verdadero ctDNA, sobre todo en situaciones que favorecen los procesos de muerte celular (cirugía, radioterapia, quimioterapia, ejercicio intenso, inflamación), en los cuales la concentración de cfDNA puede subir de 50 a 50.000ng/mL de sangre.

Para diferenciar ambos tipos de ADN libre en sangre es útil el estudio de la **longitud del fragmento** (137). No obstante, se han desarrollado distintas técnicas ultrasensibles capaces de detectar con garantías alteraciones específicas conocidas en los genes de distintos tumores. En cualquier caso, todavía resulta necesario conocer más en profundidad la biología del ctDNA para evitar el importante sesgo de confusión con el ADN libre “normal” (cfDNA).

Además, es preciso señalar, que el ctDNA libre en sangre no es solo un marcador de enfermedad. De forma muy interesante, se ha observado en modelos experimentales que el ctDNA puede ser “absorbido” por otras células del organismo, teniendo la potencial capacidad de generar cambios en las mismas (138). Esta hipótesis de **“genometástasis”** aún no se ha comprobado explícitamente en modelos clínicos, pero da idea del potencial que el ctDNA puede tener como nueva diana terapéutica oncológica.

Métodos de detección:

Existen distintas técnicas ultrasensibles disponibles para detectar mutaciones simples de nucleótido (single nucleotide mutations) en el ctDNA o en genoma completo. Tecnicamente existirían 2 posibilidades básicas: **RealTime-PCR de mutaciones específicas** o **PCR Digital**, incluyendo *BEAMing PCR* (beads, emulsions, amplification, magnetics) o *Droplet Digital PCR*. Más recientemente, se han comenzado a emplear técnicas de secuenciación de última generación (*next-generation sequencing* o *NGS*) a través de PCR o captura-hibridación de loci genómicos específicos. La mayoría de estas

técnicas se dirigen a múltiples exones en distintos genes diana, pero recientemente se ha conseguido realizar análisis de exoma completo (*whole-exome sequencing*), análisis de aberraciones cromosómicas e incluso cambios en el número de copias a nivel del genoma completo (*whole-genome sequencing*).

Como para un clínico, esta terminología puede resultar algo confusa, de forma más práctica, podríamos decir que estas técnicas se pueden dividir básicamente en dos tipos:

- Técnicas para detectar mutaciones **específicas**. Detectan mutaciones conocidas en genes determinados (p.e. KRAS, EGFR)
- Técnicas para detectar alteraciones **inespecíficas**. Realizan un cribado del genoma y tratan de descubrir nuevas alteraciones (p.e. *array-CHG*, *whole exome sequencing* o secuenciación de exomas).

Los análisis específicos con secuenciación de última generación requieren un importante coste tanto económico como humano y técnico. Por ello, la estrategia o técnica de secuenciación a emplear dependerá de la aplicación clínica en concreto que se desee. Así, por ejemplo, para la detección y comparación de **cambios en el número de copias** se emplearán técnicas inespecíficas de *whole-genome sequencing*, con una profundidad de secuenciación x0.1; mientras que para la detección de **mutaciones o cambios genéticos específicos**, se emplearan técnicas específicas más costosas, con alta profundidad de secuenciación (x50).

En general, a pesar de las mejoras en los límites de detección, las técnicas específicas tienen una mayor sensibilidad analítica que las técnicas inespecíficas. No obstante, recientemente han ganado terreno las **técnicas ultrasensibles**, capaces de detectar cantidades ínfimas de ctDNA (139).

La tendencia futura en la detección de ctDNA es ir más allá del estudio de mutaciones específicas y pasar al estudio de **grandes paneles multigenes** para obtener una instantánea lo más completa posible del **genoma tumoral**.

✓ *ctDNA y cáncer de próstata:*

Las dianas terapéuticas suelen ser normalmente proteínas, por ello, el ctDNA puede aportar información muy valiosa acerca de alteraciones en los genes que codifican dichas proteínas y que, por tanto, pueden alterar la eficacia de los fármacos dirigidos a estas dianas. Así, por ejemplo, se pueden detectar mutaciones del **EGFR** para el cáncer de pulmón, del **KRAS** en el cáncer de colon, **TP53** o **PIK3CA** para el cáncer de mama, o también mutaciones del **RA** en el caso del cáncer de próstata.

La historia natural del cáncer de próstata en general, y del CPRCm en particular, presenta una **variabilidad genómica muy diversa y cambiante**. El análisis y monitorización del ctDNA en la sangre de estos pacientes, ofrece la posibilidad de detectar cambios en el tumor a tiempo real, sin necesidad de realizar biopsias de forma repetida, lo cual es en muchos casos imposible.

Dado el interés clínico del RA en CaP, la mayoría de estudios con ctDNA han ido normalmente encaminados a la detección de ácidos nucleicos involucrados en la expresión mutada de este receptor. Uno de los primeros trabajos al respecto (140) realizó un *genome-wide analysis* de ctDNA en pacientes con CPRC, observando la presencia de múltiples aberraciones en el locus del RA (pérdidas en el 8p y ganancias en el 8q). Más recientemente, Azad y cols (141), demostraron que la amplificación del RA era significativamente más frecuente en los pacientes que progresaban a enzalutamida que en los pacientes que progresaban a abiraterona. En otro trabajo, la presencia de la mutación AR F876L, se ha asoció a resistencia al tratamiento con un nuevo antiandrógeno (ARN-509) en pacientes con CPRCm (142). De forma similar, en un reciente estudio de Wyatt et al. (108), los autores detectaron ctDNA en muestras seriadas (antes y a los 3 meses del tratamiento) de 65 pacientes con CPRCm sometidos a tratamiento con enzalutamida. Para la detección del ctDNA emplearon hibridación genómica comparativa basada en microarrays para monitorizar mutaciones en 19 genes asociados al cáncer de próstata, y técnica de PCR para la detección de mutaciones del RA más frecuentes. Los autores observaron que el 23% de los pacientes presentaban, al menos, una mutación del RA antes de comenzar el tratamiento. Este dato es creíble, puesto que se sabe que entre el 10-20% de

los pacientes con CPRCm presentan mutaciones del RA en la biopsia tumoral. Además, demostraron que los pacientes con ganancias en las copias de RA, amplificaciones de RA, mutaciones múltiples del RA, pérdidas de RB1, ganancias de MET o de MYC; todos ellos, tenían más riesgo de tener resistencia a enzalutamida que aquellos pacientes sin estas características genéticas en su ctDNA.

Como vemos, todos los estudios apuntan a la misma dirección: **las aberraciones en el gen del RA detectadas en el ctDNA demuestran ser predictores de respuesta a la terapia de privación androgénica.**

A.3.2.3.- ¿CTCs vs ctDNA?

Tanto CTCs con ctDNA han demostrado su potencial como biomarcadores en cáncer de próstata, pero es fácil que inmediatamente surja la simplista duda de: ¿cuál es mejor?.

Existe actualmente un debate (probablemente motivado solo por intereses comerciales) que trata de ver a las CTCs y el ctDNA como competidores, luchando por ver cual de los dos es capaz de aportar una información clínica más útil. No obstante, la información de CTCs y ctDNA es distinta y es por tanto probable, que sea la correcta comprensión y **conjunción** de ambas fuentes la que más utilidad aporte.

La industria tecnológica para la detección de CTCs y ctDNA está totalmente saturada en el momento actual. Existe una continua aparición de nuevos y mejorados equipos y plataformas de detección, con lo cual es fácil perderse en la literatura y en los cambiantes objetivos. En este apartado trataremos de resumir y comparar de la forma más práctica posible las ventajas e inconvenientes de ambas tecnologías.

La cuantificación de ambos (CTCs y ctDNA) se ha asociado de forma clara con el pronóstico de la enfermedad, lo cual refleja su buena correlación con la agresividad tumoral. Además, ambos permiten una fotografía a tiempo real de la biología molecular del tumor, incluyendo la valoración del RA. Por tanto, probablemente esta dicotomía no se solucione eligiendo al mejor, sino **combinando ambos de la forma adecuada**. Mientras que el ctDNA es probablemente más adecuado para la detección de mutaciones genómicas sobre las que actuar, las CTCs probablemente lo sean más para la detección de alteraciones en la expresión del ARN, expresión de proteínas, valoración de heterogeneidad celular y establecimiento de cultivos a largo plazo.

El ctDNA tiene la **ventaja** de ser **más fácil y más barato** de detectar que las CTCs, por tanto, es más adecuado para análisis seriados a gran escala de mutaciones específicas tumorales. El rápido avance y la disminución progresiva en los costes de estos análisis, probablemente faciliten más la implementación del ctDNA en la rutina clínica antes que las CTCs. Sin embargo, la detección de ctDNA **no está todavía estandarizada y/o validada**

clínicamente, y aparecen continuamente nuevos y mejores métodos de detección que aún tendrán que validar sus resultados. Hasta la fecha, existe únicamente un test estandarizado y validado clínicamente: el *Test Cobas® v2 de la mutación del EGFR* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA), empleado específicamente para la predicción de respuesta a Tarceva® (erlotinib) en cáncer de pulmón de no células pequeñas (143).

Una **desventaja** del ctDNA es el **sesgo de dilución por cfDNA**. Actualmente, en una muestra sin cambios en el número de copias o sin mutaciones (negativa para ctDNA) es imposible discriminar si se trata de una ausencia verdadera de ctDNA (verdadero negativo) o de un sesgo por dilución en el cfDNA (falso negativo). Además, a diferencia de las ganancias, la detección de pérdidas es especialmente difícil de detectar con una baja cantidad de ctDNA disponible, y se estima que es preciso al menos una ratio mínima del 10% para poder determinarlas.

La presencia de ctDNA se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad. Incluso parece demostrada la **correlación entre el ctDNA y un recuento de CTCs >5** (141).

Respecto a las CTCs, su detección requiere más recursos económicos y técnicos. Sin embargo presenta la ventaja con respecto al ctDNA de que existe en el mercado una plataforma estandarizada aprobada por la FDA para su detección (CellSearch), la cual ha demostrado el valor predictivo y potencial marcador sustituto de supervivencia global de las CTCs en distintos estudios. A pesar de la gran cantidad de evidencia prospectiva que han cosechado las CTCs como marcadores pronósticos, no se ha conseguido aún implementar su detección en la rutina clínica. Probablemente, desde el punto de vista clínico es más interesante la cualidad predictiva, capaz de condicionar el tratamiento y manejo de un paciente, que la cualidad pronóstica de un marcador.

Esta capacidad predictiva, todavía no ha sido firmemente demostrada por las CTCs. El reciente y famoso estudio de Antonaraiakis (134) demostró recientemente que la detección de una variante splice del RA (AR-V7) en las CTCs, era capaz de predecir la respuesta al tratamiento con abiraterona/enzalutamida en pacientes con CPRCm. Este fue el primer ejemplo de la capacidad predictiva de estas células, sin embargo todavía son

necesarios más estudios que validen estos resultados. Este tipo de análisis ulterior a la enumeración de las CTCs, con análisis más complejos, no tienen una metodología estandarizada y deben ser todavía sometidos a validación. En las CTCs se pueden realizar multitud de **análisis de expresión**: expresión de ARNm del RA y sus variantes splice, secuenciación del transcriptosoma completo del ARN, expresión de PSA/PSMA, determinación de Ki-67 o incluso determinación de la actividad de telomerasa, la cual recientemente demostró ser un predictor independiente de supervivencia global en el ensayo SWOG 0421. Además, las CTCs ofrecen la posibilidad de analizar la **heterogeneidad tumoral**, a través del análisis genético y morfológico de las distintas células.

Por último, probablemente una de las capacidades más importantes y aún por explotar de las CTCs, sea su capacidad para **cultivarse in vitro** y, por tanto su potencial para someterse en el laboratorio a **tests de susceptibilidad** individual a determinados tratamientos, de la misma manera que se realizan los cultivos microbiológicos y sus antibiogramas (*“oncograma”*). El cultivo de CTCs se ha demostrado como posible en pacientes con CPRCm, pero aún queda un largo camino para su optimización y aplicabilidad clínica (96, 97).

En la siguiente tabla se exponen, de forma resumida, las principales diferencias entre CTCs y ctDNA que hemos descrito anteriormente (tabla 9).

CTCs	ctDNA
<p>Más adecuadas para análisis de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ expresión del ARN y proteínas ✓ valoración de heterogeneidad tumoral ✓ posibilidad de cultivos y tests susceptibilidad 	<p>Más adecuado para análisis de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ mutaciones genómicas.
<p>Difícil almacenamiento a largo plazo para análisis posterior.</p>	<p>Fácil almacenamiento a largo plazo para análisis posterior.</p>
<p>Baja tasa de detección en enfermedad metastásica.</p>	<p>Más útil para enfermedad mínima residual o localizada.</p>
<p>Detección más compleja y costosa pero técnica estandarizada y validada (CellSearch).</p>	<p>Más fácil y más barato de detectar pero técnicas NO estandarizadas NO validadas.</p>
<p>Difícil traslación a la clínica por alto coste técnico y económico.</p>	<p>Fácil traslación a la clínica pero aún problema con sesgo por dilución con cfDNA.</p>

Tabla 8. Diferencias aplicadas entre CTCs y ctDNA

A.3.2.4.- Exosomas y AR-V7.

Además de las CTCs y el ctDNA, recientemente han irrumpido en el escenario de la biopsia líquida un nuevo integrante: los exosomas.

Los exosomas son vesículas intracelulares, de entre 50-200 nm, que pueden ser secretadas por las células tumorales y pasar a sangre, donde pueden ser detectados. Estas vesículas contienen distintas moléculas, como son proteínas y moléculas de RNA procedentes de la membrana y el citoplasma de las células tumorales de las que provienen; y se piensa que pueden tener un papel importante en la transferencia de información y sustancias activas de célula a célula durante el proceso de desarrollo tumoral. Como ejemplo, se han demostrado niveles altos de la proteína *multidrug resistance protein 1* (MDR1/ABCB1) en los exosomas de pacientes con CPRC tras tratamiento con docetaxel (144).

Pero quizás es el estudio más impactante y relevante con exosomas en cáncer de próstata sea el recientemente publicado por **Del Re y cols.** en *European Urology* en Abril 2017 (145). Es su trabajo, los autores desarrollan y describen un método para detectar la variante splice del receptor de andrógenos **AR-V7 en el ARN exosomal plasmático circulante de pacientes con CPRCm**. Ya habíamos hablado previamente de esta variante splice que apareció por primera vez, como importante biomarcador pronóstico y predictivo en CPRCm, con el trabajo de Antonarakis publicado en *New England Journal of Medicine* en 2014, en el cual demostró que la presencia de AR-V7 era un predictor de resistencia a abiraterona o enzalutamida (134). En dicho estudio, Antonarakis consiguió detectar la variante AR-V7 en las CTCs de estos pacientes; sin embargo, esta metodología de detección, a partir de las CTCs, generó bastante controversia al ser costosa, técnicamente compleja y sujeta a potenciales falsos negativos por la fragilidad y heterogeneidad de las CTCs (146). Del Re y cols, en su trabajo fueron un paso más allá al conseguir detectar la variante directamente de una muestra de plasma del paciente. Para ello emplearon la **digital droplet PCR (ddPCR)** sobre el ARN contenido en los exosomas tumorales circulantes.

Aunque todos los estudios parecen coincidir en la capacidad del AR-V7 para

predecir la resistencia a la terapia de privación androgénica en CPRCm, su detección aún no ha conseguido introducirse en la rutina clínica, probablemente debido al bajo número de pacientes incluidos en todos los estudios (p.e.: Antonarakis: 62 pacientes; Del Re: 36 pacientes).

Tanto los estudios en tejido tumoral (147) como los estudios en CTCs (134, 148) y en exosomas (145) han demostrado que la presencia de AR-V7 en pacientes con CPRCm reduce la tasa de respuesta de PSA y acorta el tiempo libre de progresión con respecto a los pacientes AR-V7 negativos. Incluso, un reciente estudio en CTCs ha demostrado que la presencia y cantidad de AR-V7 aumenta en las sucesivas líneas de tratamiento, lo cual confirma su papel como mecanismo adquirido de resistencia (149).

Podríamos resumir 3 ideas clave acerca del AR-V7 de la siguiente manera:

1.- Los estudios de AR-V7 en tejido prostático están limitados por la baja disponibilidad del tejido en estos pacientes (enfermedad ósea metastásica), así como porque no son representativos de la heterogeneidad del tumor en su conjunto y no permiten una monitorización evolutiva.

2.- Los estudios de AR-V7 en CTCs son caros, complejos y sujetos a sesgo de detección por la fragilidad de las células.

3.- La detección de AR-V7 en exosomas tumorales circulantes y el análisis de su contenido resulta considerablemente **más barato y sencillo** que la detección y procesamiento de las CTCs, además permiten tener **información de la heterogeneidad** tumoral y también permiten la **monitorización evolutiva** de la enfermedad al ser fácilmente accesibles (sangre periférica).

Por todo ello, los exosomas constituyen una importante línea de investigación futura, aunque todavía sean necesarios estudios que optimicen y estandaricen su detección, así como ensayos clínicos más amplios que validen sus resultados.

B.- MATERIAL Y MÉTODOS

B1.- Diseño del estudio y criterios de inclusión.

B2.- Procesamiento de las muestras.

B2.A.- Enriquecimiento y detección de las CTCs.

1°.- Separación por gradiente de densidad

2°.- Selección inmunomagnética

3°.- Detección de células epiteliales por inmunohistoquímica.

4°.- Identificación y enumeración.

B2.B.- Análisis de expresión de ARNm de EGFR y RA en tejido prostático

B2.C.- Genotipado de polimorfismos de cambio único de nucleótidos
(*Single Nucleotide Polymorphisms o SNPs*).

B3.- Medida y análisis estadístico de los resultados .

B1.- Diseño del estudio y criterios de inclusión:

Este estudio se basa en un análisis transversal de pacientes con sospecha clínica de cáncer de próstata que fueron sometidos a biopsia prostática entre Mayo y Diciembre de 2014 en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Basándonos en un **screening de PSA individual**, se incluyeron en el estudio todos aquellos pacientes que reunieran criterios para biopsia prostática (PSA>10 ng/ml o PSA entre 4 y 10 ng/ml con un cociente libre/total PSA <0.2).

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con historia previa de cáncer de cualquier otro tipo.

Inmediatamente antes de la biopsia, se realizó una **extracción de 20cc de sangre** periférica para el análisis de CTCs y estudios de genotipado (SNPs). Tras la extracción sanguínea, el paciente pasaba a quirófano donde se le realizaba una biopsia de próstata sistemática ecodirigida. De todos los pacientes se extrajeron 20 cilindros (biopsia por saturación) sistematizando su extracción en 6 cuadrantes (3 ápex, 4 centro y 3 base derechos; y 3 ápex, 4 centro y 3 base izquierdos).

El análisis de las muestras se realizó en el Centro Pfizer-Junta de Andalucía-Universidad de Granada de Genómica e investigación Oncológica (Genyo). En todo momento los técnicos de laboratorio fueron ciegos para el PSA y para el resultado de las biopsias. Este proyecto se realizó siguiendo la normativa de protección bioética del protocolo de Helsinki. El Comité Ético del Hospital aprobó el protocolo del estudio y todos los pacientes fueron informados y firmaron su consentimiento antes de entrar en el estudio.

B2.- Procesamiento de las muestras:

B2.A.- Enriquecimiento y detección de las CTCs:

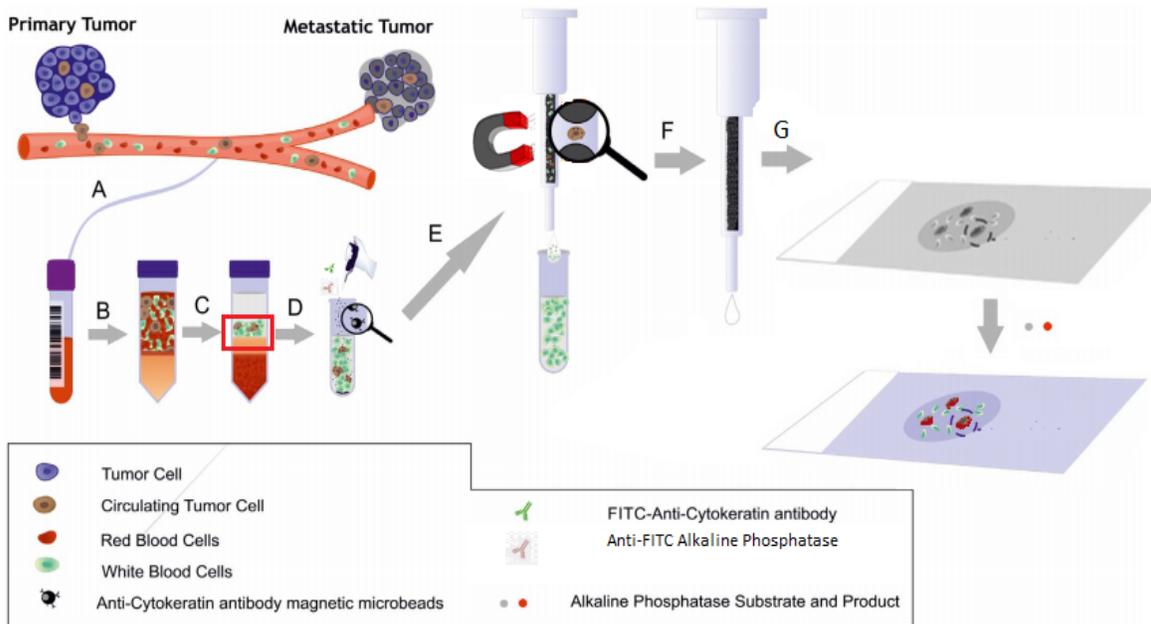
La muestra sanguínea se depositaba en tubos EDTA, o bien en tubos CellSave (Veridex, LLC, Johnson & Johnson Company) si el procesamiento se iba a realizar más allá de las 24 horas desde la extracción. En cualquiera de los casos, la muestra se procesaba siempre antes de 48h, según el protocolo previamente establecido por nuestro grupo, utilizando el **kit de Carcinoma Cell Enrichment and Detection de MACS** (Miltenyi Biotec, Germany) (154) (*Esquema 1*).

Para identificar las CTCs, se realizó una **selección positiva inmunomagnética** basada en la tinción con **anticuerpos específicos anticitoqueratinas (CK)** (CTCs CK+). Como controles negativos se emplearon las muestras sanguíneas de 17 voluntarios sanos sin antecedentes de patología tumoral. Como controles positivos, se emplearon las muestras de voluntarios sanos enriquecidas con células de líneas de cáncer de próstata conocidas (LNCaP, DU145), que se procesaban de forma separada a la sangre de los pacientes para evitar la contaminación.

Estos serían los pasos detallados del proceso de selección y detección de las CTCs:

1º.- Separación por gradiente de densidad:

Enriquecimiento de la muestra mediante el uso de un gradiente de ficoll. En nuestro caso se utilizó el ficoll de *Sigma Histopaque-1119*. El protocolo consiste en añadir con cuidado sobre 10ml de ficoll 10ml de sangre previamente diluida en 5ml de PBS. La muestra es entonces centrifugada a 750 g 30' y con freno. Una vez centrifugada se recoge la interfase donde estarán las células hematopoyéticas de densidad similar al ficoll y las CTCs que presenten la misma densidad. Una vez recogida la interfase se procede a su lavado en 15ml de PBS.



Esquema 1. (A) Extracción sangre periférica en tubo EDTA; (B) transferencia a tubo de centrifugación mediante gradiente de densidad; (C) centrifugado a $750 \times g$ durante 30 min; (D) Se recoge la interfase que contiene células mononucleares y tumorales, y se realiza etiquetado inmunomagnético con Ac conjugado anticitoqueratina (E) Separación celular magnética utilizando el separador MiniMACS; (F) lavado celular; (G) colocación de las células en cristal de polilisina utilizando centrifugador CytoSpin; and (H) Reacción inmunocitoquímica de la fosfatasa alcalina con FAsTRed/Naphthol.

2°.- Selección inmunomagnética:

Posteriormente las células se enriquecían y detectaban de forma magnética de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit *Carcinoma Cell Enrichment and Detection de MACS* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Según este protocolo, las células se diluían en 35ml de buffer dilutor 1x de MACS. Luego, se permeabilizaban añadiendo 5ml de solución MACS CellPerm y se incubaban durante 5 minutos a 20-25°. Por último, se fijaban con 5ml de solución fijadora Cellfix MACS en otro período de incubación de 30 minutos a 20-25°.

Tras esto, las células se lavan dos veces en una solución CellStain x1 de MACS y se resuspenden en 600 μ l de la misma solución. Para bloquear los receptores Fc, se añaden 200 μ l de Agente bloqueador de FcR (FcR Blocking Reagent) y las células son captadas

magnéticamente a través de MACS Cytokeratin MicroBeads (colloidal super-paramagnetic MicroBeads conjugated to a monoclonal anti-cytokeratin 7/8 antibody; Clone: CAM5.2) mientras se incuban durante 45 minutos a 20-25°.

Después de la selección magnética propiamente dicha, las células se tiñen con 100 µl de conjugado anticitoqueratina-isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 10 minutos a 20-25°. Después, las células se lavan y se resuspenden en 500 µl de solución CellStain para teñirse finalmente con 10 µl de conjugado antiFITC + fosfatasa alcalina durante 10 minutos en condiciones de oscuridad a 20-25°.

Tras el paso anterior, se obtiene una solución de células magnéticamente seleccionadas. Esta solución se pasa por una columna de separación positiva por campo magnético de la plataforma MiniMACS (columna de separación MiniMACS, tipo MS).

Las células pasan por la columna y se lavan tres veces con 500 µl de buffer de dilución x1 MACS. De esta manera, las células negativas (magnéticas negativas) se lavan y eliminan de la columna. Tras este lavado, la columna se retira del campo magnético creado y se recogen las células que han quedado atrapadas en él (células magnéticas positivas).

3°.- Detección de células epiteliales por inmunohistoquímica.

Las células magnéticas positivas se extienden en portas impregnados con polilisina (Sigma) y se introducen en la citocentrifugadora (Hettich, Tuttlingen, Germany) a 1.500 rpm durante 10 minutos. Los portas se secan a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente, los portas se lavan en x1 PBS y las células que expresan citoqueratinas (CK+) deben aparecer como rojas tras incubarse durante 15 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente con un sustrato Fast Red TR/Naphthol AS-MX. Se emplearon los criterios citomorfológicos de Meng (150) (p.e.: elevada ratio núcleo/citoplasma, mayor tamaño que las células blancas) para caracterizar a una célula CK

positiva como CTC. De esta manera, con microscopio de luz directa se visualizaron las CTCs y se determinaron como tales según un **análisis combinado citomorfológico** (criterios de Meng) **e inmunofenotípico (CK+)**.

Adicionalmente para la **detección del receptor de andrógenos (RA)** en estas CTCs, los portas con CTCs detectadas se lavaban en 1x PBS y se teñían con anticuerpos de cabra policlonales anti-RA humano (Abcam), seguidos de una incubación con anticuerpos de burro policlonales anti-cabra Alexa Fluor® 350 (Molecular Probes. Invitrogen).

Así, las células epiteliales se caracterizaron como CTCs según su color rojo (CK +) y su color azul (RA +). La tinción del color se puede diferenciar bien en las células debido a su distinta distribución intracelular y la combinación de inmunofluorescencia directa e indirecta. La tinción roja ocurre en la membrana, periferia celular y la tinción azul acontece en el núcleo (figura 9).

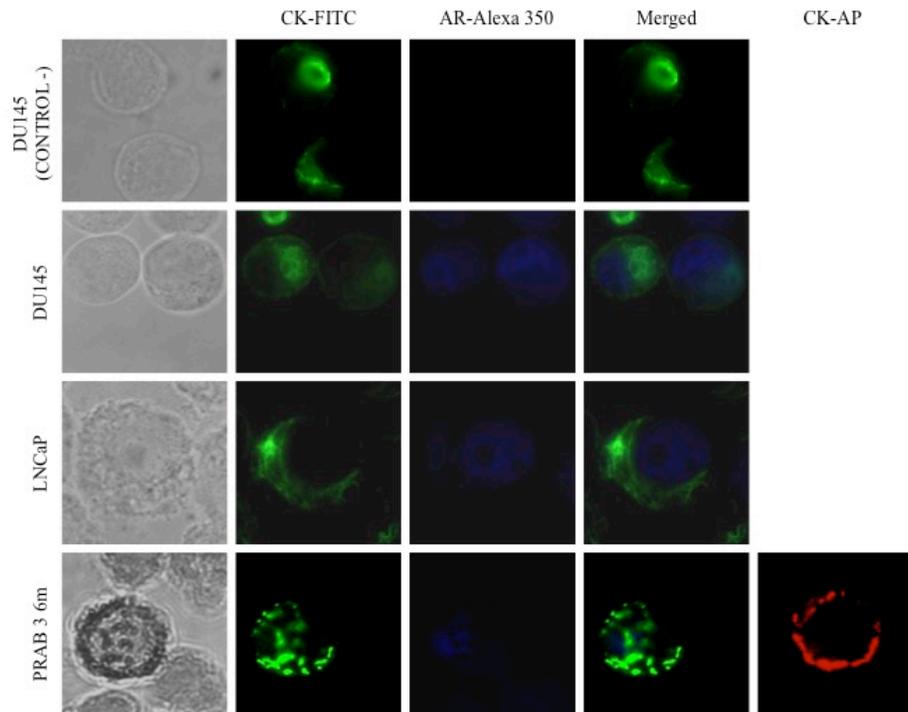


Figura 9. Galería de imágenes después del aislamiento, análisis citomorfológico y detección de células positivas a citoqueratina (CK +, tinción roja) y expresión del receptor de andrógenos (AR, tinción azul).

A) Se utilizó la línea de tumor de células LNCaP como control positivo para la expresión de AR. B) Expresión heterogénea de RA en dos pacientes diferentes: B.1) Paciente 1 con expresión positiva de AR en CTC. B.2) Paciente 2 con expresión negativa de AR en los CTC. Los CTC de inmunofluorescencia (IF) específicos de AR se determinaron con Alexa Fluor® 350.

4°.- Identificación y enumeración combinando microscopia convencional con microscopía confocal:

La identificación y enumeración final de las células se realizó a través de las imágenes obtenidas con un **microscopio láser confocal** / multi fotón Zeiss LSM 710, equipado con láser Argón/2 (458, 477, 488, 514 nm) y un láser Titanio Sapphire (750 nm). Las células se visualizaron con varios objetivos apocromáticos y se inmortalizaron distintas imágenes confocales con magnificación x60 (figura 10). El conteo se realizó con el programa de imagen microscópica fluorescente computerizada Zeiss AXIO Imager.

Se consideró como CTC positivo, a cualquier paciente con ≥ 1 CTCs CK+/10 ml.

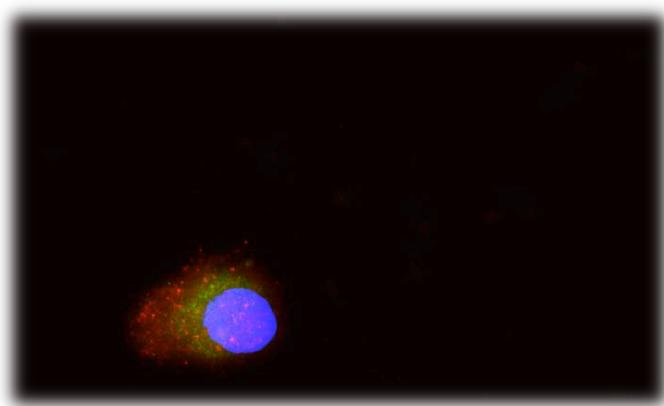


Figura 10: visión de una CTC con microscopía confocal.

B2.B.- Análisis de expresión de ARNm de EGFR y RA en tejido prostático

Para este estudio también se recolectó tejido prostático fresco, que se almacenó a -80°C hasta su posterior procesamiento. Un patólogo seleccionó una muestra representativa de la biopsia para someterla a este análisis. El ARN tisular total se extrajo utilizando un procedimiento siguiendo protocolos de extracción orgánica usando Trizol (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Sobre este ARN, se realizó Real-Time PCR (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). La tabla siguiente muestra el detalle de los primers utilizados para este análisis. Todos los primers fueron diseñados utilizando el software Primer 3, y fueron sintetizados por Sigma Aldrich®.

Diseño de los primers para análisis de la expresión de ARNm en el tejido.

Nombre del Gen	Detalle secuencia del primer
EGFR (Epidermal growth factor receptor)	
Forward	5'-TGCACCTACGGATGCACTG -3',
Reverse	5'- CGATGGACGGGATCTTAGG -3'
AR (Androgen Receptor)	
Forward	5'- GACATGCGTTTGGAGACTGC-3'
Reverse	5'- TTCCCTTCAGCGGCTCTTTT-3'
GADPH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)	
Forward	5'- ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA -3'
Reverse	5'- CATGGTTCACACCCATGACGAACA -3'
HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase 1)	
Forward	5'- TGACACTGGCAAACAATGCA-3'
Reverse	5'- GGTCTTTTCACCAGCAAGCT-3'

La expresión del gen del EGFR y RA en el tejido prostático se analizó mediante el sistema 7900 Real-Time PCR (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Cada test se realizó 4 veces para evitar errores de expresión.

Para demostrar la expresión relativa de cada gen aplicamos el método ΔC_t , con el cual se normaliza la expresión del gen en base a dos genes control o *housekeeping* (en nuestro caso, GADPH y HPRT1). Los valores de $C_t > 35$ fueron descartados del estudio para evitar falsos positivos.

B2.C.- Genotipado de polimorfismos simples de nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms o SNPs*).

Se eligieron 8 SNPs (rs56250729, rs486907, rs627928, rs11545302, rs17552022, rs5030739, rs4792311, rs3747531) prevalentes en la población caucásica, procedentes de 3 importantes genes claramente asociados al cáncer de próstata (RNASEL, ELAC2 y MSR1). La siguiente tabla muestra más en detalle las sondas de la casa comercial TaqMann utilizadas para el genotipado.

Detalle de las sondas de SNPs utilizadas.

Nombre del Gene	Detalles de la sonda
RNASEL	rs56250729 (C_28997511_10)
	rs486907 (C_935391_1)
	rs627928 (C_1914241_10)
ELAC2	rs11545302 (C_25981758_10)
	rs17552022 (C_25981570_10)
	rs5030739 (C_25981698_10)
	rs4792311 (C_25981579_20)
MSR1	rs3747531 (C_16172249_30)

Para cada reacción, se utilizaron 10ng de DNA genómico con una mezcla 2 × TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: activación inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 50 ciclos de 15 segundos a 92°C y extensión a 10 minutos a 90°. Un 10% de las muestras fueron amplificadas y secuenciadas por método Sanger en un HID1 3130 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) para confirmar los datos.

B3.- Medida de resultados y análisis estadístico.

La presencia de CTCs se analizó como marcador diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata. Los resultados de la biopsia se tomaron como el gold estándar con el que comparar. De esta manera, se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las CTCs para el diagnóstico de cáncer de próstata.

Se estudiaron las relaciones entre la presencia de CTCs y las principales variables clínicas y patológicas de los pacientes. También se estudiaron las relaciones entre la presencia de CTCs y la expresión de EGFR, RA y SNPs en el tejido y la sangre de los pacientes.

La comparación de medias se realizó con la t-Student. Para los datos categóricos, se usó el test de Fischer. Los datos de RT-PCR se expresaron como ΔCt : la diferencia en Ct entre el gen en cuestión (RA o EGFR) y el Ct medio de otros dos genes control (GADPH and HPRT1). La significación estadística de la expresión diferencial entre los grupos se analizó mediante test de Wilcoxon. Todos los análisis se realizaron con el formato estadístico R.

C.- RESULTADOS

- C1.- Enumeración de CTCs.
- C2.- Detección de RA en las CTCs.
- C3.- CTCs como marcadores diagnósticos de cáncer de próstata.
- C4.- Expresión de EGFR y RA en el tejido vs presencia de CTCs.
- C5.- Genotipo SNPs vs presencia de CTCs.

C1.- Enumeración de CTCs

Se analizaron las muestras sanguíneas de un total de **86 pacientes**, según los criterios de inclusión antes mencionados.

En primer lugar, se analizó la presencia de CTCs en la cohorte de pacientes. Solo se detectaron CTCs en el 18.6% de los pacientes (16/86). El resto (81.4%) fueron negativos para la presencia de CTCs. Además, la mayoría de los pacientes con CTCs solo presentaban 1 o 2 CTCs (tabla 1).

Table 1: Results of CTC counting in the 86 patients

Number of CTC (cells / 10mL)	Number of patients (%)
None	70 (81.4%)
1	6 (7.0%)
2	7 (8.1%)
3	1 (1.2%)
4	2 (2.3%)

Posteriormente, estratificamos las características clínicas de los pacientes según la presencia o ausencia de CTCs para establecer diferencias entre los dos grupos. La presencia de CTCs se asoció únicamente con una edad menor ($p=0.030$). No se encontraron diferencias significativas con el resto de características, incluyendo PSA_t, volumen prostático, cociente PSA_f/PSA_t o niveles de testosterona (tabla 2).

Table 2: Comparison of mean values for the different clinical characteristics of patients according to their CTC status

	CTCs negative Mean ± SEM (n=70)	CTCs positive Mean ± SEM (n=16)	p value
Age (years)	69.77 +/- 0.9	65.31 +/- 2.4	0.030
Prostate volume (mL)	48.42 +/- 21.21	56.58 +/- 40.53	0.871
tPSA (ng/mL)	11.74 +/- 9.64	10.66 +/- 6.77	0.336
fPSA (ng/mL)	1.05 +/- 0.56	0.98 +/- 0.40	0.346
fPSA/tPSA ratio	0.16 +/- 0.97	0.14 +/- 1.21	0.235
Testosterone (ng/mL)	5.74 +/- 2.74	4.88 +/- 1.78	0.132

CTCs negative: patients with none CTCs detected. *CTCs positive:* patients with 1 or more CTCs detected. *tPSA:* total PSA. *fPSA:* free PSA. *SEM:* standard error of the mean.

C2.- Detección de RA en las CTCs.

De los 16 pacientes en los cuales se encontraron CTCs, 12 (75%) fueron RA negativos y 4 (25%) fueron RA positivos. No encontramos asociaciones significativas entre la presencia de RA en las CTCs y las características clínicas de los pacientes (PSA, volumen de próstata, niveles de testosterona). Tampoco se encontró una asociación significativa entre la presencia de RA en las CTCs y la presencia de cáncer en las biopsias.

CTCs RA-positivas	CTCs RA-negativas
25% (4/16)	75% (12/16)

C3.- CTCs como marcadores diagnósticos de cáncer de próstata.

Un total de 35 (40.7%) pacientes fueron cáncer positivos en la biopsia, mientras que en 51 (59.3%) no se detectó enfermedad maligna en las biopsias. Entre los pacientes con **biopsia positiva**, solo el 14.3% (5/35) presentaron también CTCs en sangre, mientras que el 85.7% restante (30/35) no presentaron CTCs. Entre los pacientes con **biopsia negativa**, hasta el 21.6% (11/51) presentaron CTCs en sangre, mientras que la mayoría (40/51, 78.4%) no presentaron CTCs (table 3). Con estos datos, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las CTCs para el diagnóstico de cáncer de próstata serían 14.2%, 78.4%, 31.2% y 57.4%, respectivamente.

Table 3: CTCs and biopsy results. According to this data, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of CTC testing to detect PCa were 14.2%, 78.4%, 31.2% and 57.4%, respectively

	Biopsy + (n=35)	Biopsy - (n=70)	
CTC +	5 (14.3%)	11 (21.6%)	16
CTC -	30 (85.7%)	40 (78.4%)	70
	35	51	86

CTC +: >1cell/10mL. Biopsy +: pathologic evidence of prostate cancer.

Además, no se encontró ninguna asociación significativa entre la presencia de CTCs y los principales hallazgos anatomopatológicos de la biopsia, como el número de cilindros afectados, score Gleason, presencia de invasión perineural o la categoría de riesgo de D'Amico (table 4).

Table 4: Prostate cancer characteristics of biopsy + patients (n=35)

	CTC -	CTC +	p value
Number cylinders affected (mean)	8.06	5.8	0.157
Gleason score			0.227
6	15 (50%)	1 (20%)	
≥ 7	15 (50%)	4 (80%)	
Perineural invasión	4 (13.3%)	0 (0%)	0.523
Risk category			0.482
Low	12 (40%)	1 (20%)	
Intermediate	8 (26.6%)	3 (60%)	
High	10 (33.4%)	1 (20%)	

C4.- Expresión de EGFR y RA en el tejido vs presencia de CTCs.

La expresión de EGFR y RA en el tejido biopsiado fue analizada en 55 pacientes.

La **expresión de EGFR** no se asoció ni con la presencia de cáncer en las biopsias ($p=0.950$) ni con la presencia de CTCs ($p= 0.255$). De forma interesante, observamos que la presencia de RA en las CTCs se asoció de forma inversa a la presencia de EGFR en el tejido. Todos los pacientes (100%) con CTCsRA-positivos fueron EGFR-negativos en el tejido; mientras que la mayoría (75%) de pacientes CTCsRA-negativos fueron EGFR-positivos, si bien esta diferencia no estadísticamente significativa dado el bajo número de casos.

De forma similar, la **expresión de RA** de andrógeno en el tejido no se asoció con la presencia o ausencia de cáncer en la biopsia. Sin embargo, observamos una relación directa estadísticamente significativa entre la expresión de RA en el tejido y la presencia de CTCs en sangre periférica ($p=0.03$) (Figura 1). Cuando se comparó la expresión de RA en el tejido y en las CTCs no se encontró ninguna asociación ($p=0.340$).

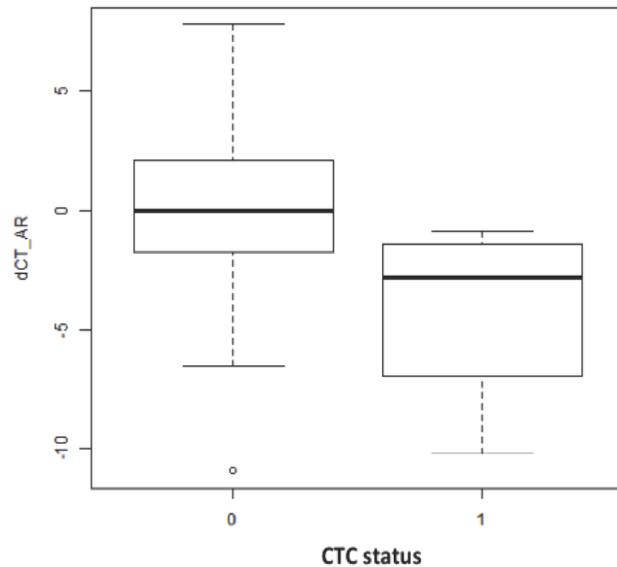


Figura 1:

Representación de la expresión de RA en el tejido prostático (valores dCT) vs presencia de CTCs (0: CTC-negative; 1: CTC-positive) ($p=0.03$).

La línea dentro de la caja representa la expresión media de RA para cada grupo. Cuanto mayor es el valor de dCT, menor es la expresión de RA.

C5.- Genotipo SNPs vs presencia de CTCs.

El genotipo de los 8 SNPs antes mencionados fue determinado también en 55 de los 86 pacientes. Cada SNP fue contrastado de forma individual con la presencia / ausencia de cáncer en la biopsia y con la presencia / ausencia de CTCs en sangre. No se encontró ninguna asociación significativa. Dado que su interpretación es compleja y no se encontró ninguna asociación hemos decidido no mostrar estos datos.

D.- DISCUSIÓN

Discusión:

Hasta donde sabemos, este trabajo de investigación representa el primer y mayor estudio, con un panel de biomarcadores sanguíneos circulantes (biopsia líquida), en pacientes con sospecha de cáncer de próstata basada en el screening individual de PSA. Nuestro estudio no solo analiza la mera presencia de CTCs, sino que también las caracteriza según su expresión de receptor de andrógenos (RA). Además, estudia la asociación de las CTCs con otros marcadores tisulares relacionados con el cáncer de próstata.

Las CTCs se ha estudiado extensamente en el escenario metastásico, donde han demostrado su asociación clara con el pronóstico del paciente (84). Sin embargo, muy pocos estudios han analizado el papel pronóstico de las CTCs en el escenario clínico localizado. Los estudios con CTCs en cáncer de próstata localizado no han conseguido demostrar el potencial valor de estas células (90, 92, 151, 152). Una posible explicación a este hecho, es la baja tasa de detección celular en estos pacientes en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, estos estudios han sido realizados en cohortes de pacientes muy pequeñas y heterogéneas como para poder extraer conclusiones y desterrar las CTCs de los estadios iniciales de la enfermedad.

Uno de los estudios más relevantes sobre CTCs en cáncer de próstata en estadio localizado es el de Davis y cols (92). En este estudio se enumeraron las CTCs mediante la plataforma CellSearch® en 96 pacientes con cáncer de próstata localizado antes de someterse a prostatectomía radical y se compararon con 25 controles con elevación del PSA y biopsia negativa. Los autores detectaron CTCs en el 21% vs 20% de los pacientes con cáncer localizado y pacientes controles, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los de nuestro estudio, con una tasa de detección de 18.6% en pacientes con elevación del PSA. Al igual que nosotros, los autores tampoco encontraron ninguna relación entre las CTCs y el volumen tumoral, estadio patológico o puntuación Gleason. Otro estudio similar y más reciente sobre 152 pacientes tratados con prostatectomía radical,

tampoco consiguió encontrar ninguna relación entre las CTCs y el PSA, el Gleason o la tasa de recidiva bioquímica durante dos años de seguimiento (151).

La mayoría de estudios demuestran que las CTCs no se correlacionan con las características clinicopatológicas de la enfermedad localizada y el tumor primario. Así fue también en nuestro estudio, excepto para el caso de la edad. Los pacientes más jóvenes tuvieron más probabilidad de tener CTCs en sangre que los pacientes mayores. Este hallazgo ya se había demostrado en otros estudios (153) donde se observó que pacientes mayores de 60 años tenían un mayor número de CTCs en sangre que los menores de esa edad. Se piensa que esto puede ser debido a una mayor capacidad proliferativa y facilidad de diseminación en los pacientes jóvenes. También está en sintonía con el hecho de que el cáncer de próstata en los pacientes más jóvenes parece tener comportamientos más agresivos.

La ausencia de correlación de las CTCs con las variables clinicopatológicas clásicas hace pensar que la presencia de estas células esté realmente más determinada por la **biología intrínseca del tumor** (todavía no bien dilucidada) que por la simple extensión clínica o gradación patológica de la enfermedad.

Las CTCs no pueden ser consideradas como marcadores diagnósticos de cáncer de próstata (90, 92). Su tasa de detección es muy baja en pacientes con enfermedad localizada y nuestros resultados vuelven a confirmar este hecho. Sin embargo, es posible que la mera enumeración de CTCs sea un abordaje demasiado simplista para este tipo de pacientes, más aún conociendo la complejidad de la biología molecular del cáncer de próstata.

La caracterización específica de las CTCs está ganando cada vez más importancia por su potencial valor pronóstico y predictivo (154). Por ello, a diferencia de los estudios previamente descritos, en nuestro trabajo tratamos de caracterizar fenotípicamente las CTCs según su expresión de receptor androgénico (RA). Nuestros resultados muestran que la mayoría de CTCs en este estadio clínico son RA-negativas. Liu y cols (155) sugirieron que el tumor de próstata primario podría albergar tanto células RA-positivas como RA-negativas, lo cual sería consistente con nuestros hallazgos; ya que, además, observamos que

las CTCs podían mostrar expresión heterogénea del RA tanto entre pacientes distintos como en un mismo paciente. Por tanto, es factible que tumores RA-positivos liberen al torrente sanguíneo CTCs RA-negativas y viceversa. Este fenómeno ha sido también estudiado en otros tipos de tumores hormono dependientes, como el cáncer de mama (156) y tiene importantes implicaciones predictivas de cara a la estrategia terapéutica a tomar. Es posible que el estatus de RA en las CTCs pueda ser un potencial marcador predictivo de respuesta a las terapias de deprivación androgénica, sin embargo aún no sabemos la manera óptima de cuantificar su heterogénea expresión en estas células (136).

Por otro lado, es destacable el valor del EGFR en el proceso metastásico y su relación con el RA. El RA puede ser activado indirectamente por distintos receptores y factores de crecimiento, sobre todo por el EGFR. Si bien, la forma en que ejerce su influencia sobre la enfermedad no está aún clara del todo. Por un lado, existe evidencia consistente de que la sobreexpresión del EGFR contribuye a la progresión del cáncer de próstata de hormonosensible a CPRC (157, 158) y de que es un promotor de los procesos de transformación epitelio-mesénquima (EMT) (159). Por otro lado, a nivel experimental se ha observado una relación inversa entre la expresión de RA y la adquisición de características EMT, es decir, menor expresión de RA favorecería procesos de EMT (160). Un reciente estudio in vitro sobre líneas celulares de cáncer de próstata con diferentes sensibilidades al andrógenos observó que la expresión de EGFR era máxima en las células RA-negativas (161). Nuestros resultados a nivel clínico son congruentes con estas evidencias experimentales, mostrando una relación inversa entre el EGFR y el RA en las CTCs. En otras palabras, en nuestro estudio la mayoría de pacientes fueron CTC-RA-negativos con tejido EGFR-positivo. Por tanto, se puede hipotetizar que aquellos pacientes EGFR-positivos en tejido y RA-negativos en CTCs, puedan constituir un subgrupo de riesgo pronóstico, dada su potencial capacidad para desarrollar procesos de EMT.

Está ampliamente aceptado que los andrógenos juegan un papel clave en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. En nuestro estudio observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión de RA en el tejido prostático y la presencia de CTCs, lo cual sugiere que un incremento en la expresión de RA en la próstata puede ser un facilitador del proceso de diseminación celular a sangre periférica. Este hallazgo clínico

está sustentado también por evidencia reciente a nivel experimental. Se ha demostrado como los andrógenos son capaces de inducir procesos EMT en líneas celulares de cáncer de próstata, lo cual es un paso fundamental para adquirir la capacidad de migración y potencial invasión a distancia (160).

Con respecto a las variantes genéticas que detectamos, está claro que tienen un papel en el cáncer de próstata y que pueden generar cambios en la expresión genética de estos pacientes; sin embargo, su verdadero valor pronóstico es aún incierto y existen datos contradictorios (162). Nuestros resultados respecto a los SNPs están claramente limitados por el tamaño muestral. Es posible que estudios sobre cohortes más amplias de pacientes aclaren mejor el verdadero papel de estos potenciales biomarcadores.

Limitaciones:

Somos plenamente conscientes de que nuestros resultados deben interpretarse con cautela. El tamaño de muestra es limitado y es de sobra conocida la baja especificidad de la biopsia prostática para el diagnóstico de cáncer. Aunque tratamos de controlar este último potencial sesgo con la sistematización y extracción de 20 cilindros (biopsia por saturación), el número de falsos negativos puede ser aún elevado. Está programado un seguimiento a largo plazo de estos pacientes y es probable que algunos de ellos, catalogados como biopsia negativa para cáncer, puedan tener un resultado positivo en futuras biopsias.

E.- CONCLUSIONES

Conclusiones principales:

- ✓ La **baja tasa de detección de CTCs** en el cáncer de próstata localizado limita su papel como marcador diagnóstico. Sin embargo, en este trabajo de tesis hemos demostrado que estas células pueden proporcionar valiosa información pronóstica y/o predictiva, ya que **se pueden detectar distintas subpoblaciones de CTCs (RA-positivas o RA-negativas) incluso en los primeros momentos tras el diagnóstico de la enfermedad.**
- ✓ Creemos que está justificado profundizar la investigación con CTCs en estadio localizado del cáncer de próstata. No obstante, dada la baja tasa de detección, es preciso **ampliar las cohortes de pacientes** e ir más allá de su mera enumeración, estudiando **nuevas formas de caracterización** que aporten valor predictivo y pronóstico.

Conclusiones secundarias:

- ✓ Los **biomarcadores circulantes** (CTCs y ctDNA, principalmente) hicieron su aparición hace 10 años y, desde entonces, el desarrollo de nuevas técnicas de detección y la publicación de resultados traslacionales han ido creciendo a un ritmo exponencial. A pesar de ello, **aún no han conseguido hacerse un hueco en la práctica clínica habitual.** Probablemente, esto sea debido precisamente a la **desbordante y heterogénea cantidad de información disponible.** Resulta muy complejo reproducir de los resultados de los distintos estudios, e igualmente difícil compararlos sistemáticamente para poder llegar a conclusiones de impacto clínico fiables. Por ello, es necesario el **consenso y la unificación de criterios** (*Standard Operating Procedures o SOPs*). En este sentido, resultan de enorme importancia la aparición de sociedades científicas como la *International Society of Liquid Biopsy (ISLB)* que promuevan encuentros de consenso específicos (*workshops*) que faciliten el co-working y la investigación colaborativa.

F.- REFERENCIAS

Referencias:

- 1.- Siegel MA, Ma J, Zou Z, et al. CA Cancer J Clin. 2014 Jan-Feb; 64(1):9-29.
- 2.- Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with de prostate-specific antigen test. A review of current evidence. JAMA. 2014; 311(11):1143-49.
- 3.- Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, et al. Registro Nacional de Cáncer de Próstata 2010 en España. Acts Urol. Esp. 2013;37(1):12-19.
- 4.- Moyer VA. Screening for prostate cancer: US Preventive Service Task Force Recommendation statement. Annals Int Med. 2012;157(2):120-35.
- 5.- Miller AB. New data on prostate-cancer mortality after PSA screening (editorial). N Engl J Med. 2012;366:1047-8.
- 6.- Djulbegovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, et al. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials BMJ. 2010 Sep 14;341:c4543.
- 7.- Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, et al. Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial: mortality results after 13 years of follow-up. J Natl Cancer Inst. 2012;104:125-32.
- 8.- Schroeder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. Lancet. 2014;384(9959):2027-35.
- 9.- Rosario DJ, Lane JA, Metcalfe C, et al. Short term outcomes of prostate biopsy in men tested for cancer by prostate specific antigen: prospective evaluation within ProtecT study. BMJ. 2012;344:d7894.
- 10.- Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. J Clin Oncol. 2010;28:1117-23.
- 11.- Zumsteg ZS, Spratt DE, Pei I, Zhang Z, Yamada Y, Kollmeier M, et al. A new risk classification system for therapeutic decision making with intermediate-risk prostate cancer patients undergoing dose-escalated external-beam radiation therapy. Eur Urol. 2013 Dec;64(6):895-902.
- 12.- Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, Rider JR, Taari K, Busch C, et al. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. N Engl J Med. 2014;370(10):932-42.

- 13.- Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 2012 Jul;367(3):203-13.
- 14.- Zietman AL, Bae K, Slater JD, Shipley WU, Efstathiou JA, Coen JJ, et al. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1106-11.
15. Koontz BF, Bossi A, Cozzarini C, Wiegel T, D'Amico A. A Systematic Review of Hypofractionation for Primary Management of Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2014.
- 16.- Hoskin PJ, Rojas AM, Bownes PJ, Lowe GJ, Ostler PJ, Bryant L. Randomised trial of external beam radiotherapy alone or combined with high-dose-rate brachytherapy boost for localised prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2012 May;103(2):217-22.
- 17.- Sathya JR, Davis IR, Julian JA, Guo Q, Daya D, Dayes IS, et al. Randomized trial comparing iridium implant plus external-beam radiation therapy with external-beam radiation therapy alone in node-negative locally advanced cancer of the prostate. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 20;23(6):1192-9.
- 18.- Zaorsky NG, Doyle LA, Yamoah K, Andrel JA, Trabulsi EJ, Hurwitz MD, et al. High dose rate brachytherapy boost for prostate cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2014 Apr;40(3):414-25.
- 19.- Rider JR, Sandin F, Andrén O, et al. Long-term outcomes among noncuratively treated men according to prostate cancer risk category in a nationwide, population-based study. *Eur Urol* 2013 Jan;63(1):88-96.
- 20.- Tosoian JJ, Trock BJ, Landis P, Feng Z, Epstein JI, Partin AW, et al. Active surveillance program for prostate cancer: an update of the Johns Hopkins experience. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2185-90.
- 21.- Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):126-31.
- 22.- Dall'Era MA, Konety BR, Cowan JE, Shinohara K, Stauf F, Cooperberg MR, et al. Active surveillance for the management of prostate cancer in a contemporary cohort. *Cancer.* 2008;112(12):2664-70.
- 23.- Van den Bergh RC, Vasarainen H, van der Poel HG, Vis-Maters JJ, Rietbergen JB, Pickles T, et al. Short-term outcomes of the prospective multicentre 'Prostate Cancer Research International: Active Surveillance' study. *BJU Int.* 2010;105(7):956-62.
- 24.- Van As NJ, Norman AR, Thomas K, Khoo VS, Thompson A, Huddart RA, et al. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol.* 2008;54(6):1297-305.

- 25.- Berglund RK, Masterson TA, Vora KC, Eggener SE, Eastham JA, Guillonneau BD. Pathological upgrading and up staging with immediate repeat biopsy in patients eligible for active surveillance. *J Urol.* 2008;180(5):1964-7; discussion 7-8.
- 26.- Soloway MS, Soloway CT, Williams S, Ayyathurai R, Kava B, Manoharan M. Active surveillance; a reasonable management alternative for patients with prostate cancer: the Miami experience. *BJU Int.* 2008;101(2):165-9.
- 27.- Dall'Era MA, Albertsen PC, Bangma C, Carroll PR, Carter HB, Cooperberg MR, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol.* 2012;62(6):976-83.
- 28.- Marshall S, Taneja S. Focal therapy for prostate cancer: The current status. *Prostate Int.* 2015;3(2):35-41.
- 29.- Adamy A, Yee DS, Matsushita K, Maschino A, Cronin A, Vickers A, et al. Role of prostate specific antigen and immediate confirmatory biopsy in predicting progression during active surveillance for low risk prostate cancer. *J Urol.* 2011;185(2):477-82.
- 30.- Ahmed HU. The index lesion and the origin of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(17):1704-6.
- 31.- Wise AM, Stamey TA, McNeal JE, Clayton JL. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. *Urology.* 2002;60(2):264-9.
- 32.- Tanimoto A, Nakashima J, Kohno H, Shinmoto H, Kuribayashi S. Prostate cancer screening: the clinical value of diffusion-weighted imaging and dynamic MR imaging in combination with T2-weighted imaging. *J Magn Reson Imaging* 2007;25:146e152.
- 33.- Moore CM, Robertson NL, Arsanious N, Middleton T, Villers A, Klotz L, et al. Image-guided prostate biopsy using magnetic resonance imaging-derived targets: a systematic review. *Eur Urol.* 2013;63(1):125-40.
- 34.- Sonn GA, Chang E, Natarajan S, Margolis DJ, Macairan M, Lieu P, et al. Value of targeted prostate biopsy using magnetic resonance-ultrasound fusion in men with prior negative biopsy and elevated prostate-specific antigen. *Eur Urol.* 2014;65(4):809-15.
- 35.- Onik G, Narayan P, Vaughan D, Dineen M, Brunelle R. Focal "nerve-sparing" cryosurgery for treatment of primary prostate cancer: a new approach to preserving potency. *Urology.* 2002;60(1):109-14.
- 36.- Ward JF, Jones JS. Focal cryotherapy for localized prostate cancer: a report from the national Cryo On-Line Database (COLD) Registry. *BJU Int.* 2012;109(11):1648-54.

- 37.- Madersbacher S, Pedevilla M, Vingers L, Susani M, Marberger M. Effect of high-intensity focused ultrasound on human prostate cancer in vivo. *Cancer Res.* 1995;55(15):3346-51.
- 38.- Ganzer R, Fritsche HM, Brandtner A, Brendl J, Koch D, Wieland WF, et al. Fourteen-year oncological and functional outcomes of high-intensity focused ultrasound in localized prostate cancer. *BJU Int.* 2013;112(3):322-9.
- 39.- Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2011 Mar;12(3):245-55.
- 40.- Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol.* 2013 Apr 10;31(11):1428-34.
- 41.- Klein EA, Cooperberg MR, Magi-Galluzzi C, Simko JP, Falzarano SM, Maddala T, et al. A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *Eur Urol.* 2014 Sep;66(3):550-60.
- 42.- Klein EA, Yousefi K, Haddad Z, Choerung V, Buerki C, Stephenson AJ et al. A genomic classifier improves prediction of metastatic disease within 5 years after surgery in node-negative high-risk prostate cancer patients managed by radical prostatectomy without adjuvant therapy. *Eur Urol.* 2015 Apr;67(4):778-86.
- 43.- Klein EA, Haddad Z, Yousefi K, Lam LL, Wang Q, Choerung V, Decipher Genomic Classifier Measured on Prostate Biopsy Predicts Metastasis Risk. *Urology.* 2016 Apr;90:148-52.
- 44.- Optenberg SA, Clark JY, Brawer MK, et al. Development of a decision-making tool to predict risk of prostate cancer: the Cancer of the Prostate Risk Index (CAPRI) test. *Urology.* 1997;50:665-72.
- 45.- Babaian RJ, Fritsche HA, Zhang Z, Zhang KH, Madyastha KR, Barnhill SD. Evaluation of the Prostate Health Index in the detection of prostate cancer: a preliminary report. *Urology.* 1998;51:132-6.
- 46.- Eastham JA, May R, Robertson JL, Sartor O, Kattan MW. Development of a nomogram that predicts the probability of a positive prostate biopsy in men with an abnormal digital rectal examination and a prostate-specific antigen between 0 and 4 ng/mL. *Urology.* 1999;54:709-13.
- 47.- Garzotto M, Hudson RG, Peters L, et al. Predictive modeling for the presence of prostate carcinoma using clinical, laboratory, and ultrasound parameters in patients with prostate specific antigen levels ≤ 10 ng/mL. *Cancer.* 2003;98:1417-22.

- 48.- Karakiewicz PI, Benayoun S, Kattan MW, et al. Development and validation of a nomogram predicting the outcome of prostate biopsy based on patient age, digital rectal examination and serum prostate specific antigen. *J Urol*. 2005;173:1930-4.
- 49.- Suzuki H, Komiya A, Kamiya N, et al. Development of a nomogram to predict probability of positive initial prostate biopsy among Japanese patients. *Urology*. 2006;67:131-6.
- 50.- Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:529-34.
- 51.- Chun FK, Briganti A, Graefen M, et al. Development and external validation of an extended 10-core biopsy nomogram. *Eur Urol*. 2007;52:436-45.
- 52.- Nam RK, Toi A, Klotz LH, et al. Assessing individual risk for prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:3582-8.
- 53.- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. The combination of preoperative prostate specific antigen and postoperative pathological findings to predict prostate specific antigen outcome in clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 1998;160:2096-101.
- 54.- Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, et al. Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2005;23:7005-12.
- 55.- Walz J, Chun FK, Klein EA, et al. Nomogram predicting the probability of early recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*. 2009;181:601-7.
- 56.- Stephenson A, Scardino P, Kattan M, et al. Predicting the outcome of salvage radiation therapy for recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2007;25:2035-41. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2007;25:4153.
- 57.- Porter CR, Gallina A, Kodama K, et al. Prostate cancer-specific survival in men treated with hormonal therapy after failure of radical prostatectomy. *Eur Urol*. 2007;52:446-52.
- 58.- Smaletz O, Scher H, Small EJ, et al. Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer following castration. *J Clin Oncol*. 2002;20:3972-82.
- 59.- Svatek R, Karakiewicz PI, Shulman M, Karam J, Perrotte P, Benaim E. Pre-treatment nomogram for disease-specific survival of patients with chemotherapy-naive androgen independent prostate cancer. *Eur Urol*. 2006;49:666-74.
- 60.- Halabi S, Lin CY, Kelly WK, et al. Updated prognostic model for predicting overall survival in first-line chemotherapy for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 1;32(7):671-7.
- 61.- Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L. Urokinase receptor

and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 2001 Apr;12(4):863-879.

62.- Guégan J, Frémin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 pathway and its implication in hepatocyte cell cycle control. *International journal of hepatology* 2012;2012.

63.- Wendt MK, Taylor MA, Schiemann BJ, Schiemann WP. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol Biol Cell* 2011 Jul 15;22(14):2423-2435.

64.- Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):671-678.

65.- Drivalos A, Chrisofos M, Efstathiou E, et al. Expression of α 5-integrin, α 7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urol Oncol* 2016;34:165.e11-8.

66.- Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 2013;155(4):750-764.

67.- Alvarez Cubero MJ, Vázquez Alonso F, Puche-Sanz I, Ortega FG, Martin-Prieto M, Garcia-Puche JL, et al. Dormant Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: Therapeutic, Clinical and Biological Implications. *Curr Drug Targets*. 2016;17(6):693-701.

68.- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Juckstock J, et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 2011 May 1;17(9):2967-2976.

69.- Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 2011 Apr;121(4):1298-1312.

70.- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105-111.

71.- Grant CM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational Andrology and Urology* 2013;2(3):202-211.

72.- Goss PE, Chambers AF. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nature Reviews Cancer* 2010;10(12):871-877.

73.- Zhang J, Ma L. MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31(3-4):653-662.

74.- Klein CA. The direct molecular analysis of metastatic precursor cells in breast cancer: a chance for a better understanding of metastasis and for personalised medicine. *Eur J Cancer* 2008;44(18):2721-2725.

- 75.- Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, Hirota S, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med* 2011 Dec 19;208(13):2641-2655.
76. Wang Y, Yao B, Wang Y, Zhang M, Fu S, Gao H, et al. Increased FoxM1 expression is a target for metformin in the suppression of EMT in prostate cancer. *Int J Mol Med* 2014;33(6):1514-1522.
- 77.- Kim J, Wu L, Zhao J, Jin H, Yu J. TMPRSS2-ERG gene fusions induce prostate tumorigenesis by modulating microRNA miR-200c. *Oncogene* 2013.
- 78.- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 8152 – 62.
- 79.- Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S , Repollet M, O’Hara SM, et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry A* 2004; 62: 46–53.
- 80.- Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91: 411–29 .
- 81.- Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 123–34.
- 82.- Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 540–51.
- 83.- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139: 1315–26.
- 84.- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1; 14(19): 6302-9
- 85.- Cristofanilli M, Budd T, Ellis M, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8): 781-791
- 86.- 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. *J Oncol*. 2010; 2010: 617421.
- 87.- Kraan J, Schleijsler Strijbos MH, Ignatiadis M, Peeters D, Pierga JY, et al. External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch System: a feasibility study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011 Mar; 80(2): 112-8.
- 88.- Scher HI. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical

Trials Working Group. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 1148–1159.

89.- Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, et al. The Prostate Cancer Working Group 3 (PCWG3) consensus for trials in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Clin Oncol*. 2015;33:(suppl; abstr 5000).

90.- Khurana K, Grane R, Borden E, Klein E. Prevalence of Circulating Tumor Cells in Localized Prostate Cancer. *Curr Urol*. 2013 Nov; 7(2): 65–69.

91.- Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol*. 2011; 2011: 252361.

92.- Davis JW, Nakanishi H, Kumar VS, Bhadkamkar VA, McCormack R, Fritsche HA, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol*. 2008 Jun; 179(6):2187-91.

93.- Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Veganzones SB, Vidaurreta M, Martín M, et al. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Res*. 2009 Nov; 29(11):4839-43.

94.- 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. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31; 2(25):25ra23.

95.- Fizazi K, Morat L, Chauveinc L, Prapotnich D, De Crevoisier R, Escudier B, et al. High detection rate of circulating tumor cells in blood of patients with prostate cancer using telomerase activity. *Ann Oncol*. 2007 Mar; 18(3):518-21

96.- Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani, F, Madden MW, Donaldson MC, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014; 345:216-20.

97.- Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquina PJ, Karthaus WR, Gopalan A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; 159:176-87.

98.- Scher HI, Jia X, de Bono JS, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*. 2009; 10(3): 233-239.

99.- Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(23): 7053-7058.

100.- Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre

experience. *Ann Oncol.* 2009; 20(1): 27-33.

101.- Scher HI, Heller G, Molina A, et al. Evaluation of circulating tumor cell (CTC) enumeration as an efficacy response biomarker of overall survival (OS) in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): planned final analysis (FA) of COU-AA-301, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study of abiraterone acetate (AA) plus low-dose prednisone (P) post docetaxel. *J Clin Oncol.* 2011;29 (suppl; abstr LBA4517).

102.- Prentice RL. Surrogate endpoints in clinical trials: definition and operational criteria. *Stat Med.* 1989;8(4):431-440.

103.- Scher H, Heller G, Molina A, Attard G, McCormack R, Riisnaes R, et al. Abstract 2851A: Evaluation of a composite biomarker panel including circulating tumor cell (CTC) enumeration as a surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Presented at: 17th ECCO—38th ESMO European Cancer Congress*; September 2013; Amsterdam, Netherlands.

104.- Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2009; 69(7): 2912-2918.

105.- Jiang Y, Palma JF, Agus DB, et al. Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer. *Clin Chem.* 2010; 56(9): 1492-1495.

106.- Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem.* 2013; 59(1): 252-260.

107.- Friedlander TW, Ngo VT, Dong H, et al. Detection and characterization of invasive circulating tumor cells derived from men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Int J Cancer.* 2014; 134: 2284-2293.

108.- Wyatt, A.W, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance y castration-resistance prostate cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Dec 1; 2(12): 1598-1606.

109.- Shannon, CE. A mathematical theory of communication. *Bell Tech J.* 1948, 27:379-423, 623-656.

110.- Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Lu D, Louw J, et al. AR-V7 and CTC heterogeneity biomarkers additively to predict patient (pt) outcomes with taxanes relative to approved AR targeted therapy. *J Clin Oncol.* 2016. 34: 5013.

111.- Scher HI, Jendrisak A, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Greene S, et al. CTC phenotype classifier to identify mCRPC patients (pts) with high genomic instability CTCs

and to predict failure of androgen receptor signaling (AR Tx) and taxane (T) systemic therapies. *J Clin Oncol.* 2016. 34: 5044.

112.- Lowes LE, Bratman SV, Dittamore R, Done S, Kelley SO, Mai S, et al. Circulating Tumor Cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) Workshop 2016: Scientific Opportunities and logistics for cancer Clinical Trials incorporation. *Int J Mol Sci.* 2016. 17: 1505.

113.- Paule B, Brion N. EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements. *Ann. Med. Intern.* 2003. 154: 448–456.

114.- Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2000. 6: 2166–2174.

115.- Han SW, Kim T, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J. Clin. Oncol.* 2005. 23: 2493–2501.

116.- Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, Daniel B, Steuber T, Walz J, et al. Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007. 13: 6579–6584.

117.- Cho KS, Lee JS, Cho NH, Park K, Ham WS, Choi YD. Gene amplification and mutation analysis of Epidermal Growth Factor Receptor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2008. 68: 803–808.

118.- Hammarsten P, Halin S, Wikstöm P, Henriksson R, Haggstrom Rudolfsson S, Bergh A. Inhibitory effects of castration in an orthotopic model of androgen-independent prostate cancer can be mimicked and enhanced by angiogenesis inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2006. 12: 7431–7436.

119.- Guérin O, Formento P, Lo Nigro C, Hofman P, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, et al. Supra-additive antitumor effects of sunitinibmalate combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008; 134: 51–57.

120.- Weihua Z, Tsan R, Huang WC, Wu Q, Chiu CH, Fidler IJ, et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 2008. 13: 385–393.

121.- Chiorean EG, Porter JM, Foster AE, Al Omari AS, Yoder, CA, Fife KL, et al. A phase I and pharmacokinetic trial of erlotinib in combination with weekly docetaxel in patients with taxane-naïve malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2008. 14: 1131–1137.

122.- Gross M, Higano C, Pantuck A, Castellanos O, Green E, Nguyen K, et al. A phase II trial of docetaxel and erlotinib as first-line therapy for elderly patients with androgen-independent prostate cancer. *BMC Cancer* 2007. 7: 142–148.

- 123.- Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1972; 22:232–40.
- 124.- Niu Y, Chang TM, Yeh S, Ma WL, Wang YZ, Chang C. Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene*. 2010; 29:3593–604.
- 125.- Wen S, Niu Y, Ok Lee S, Chang C. Androgen Receptor (AR) Positive vs Negative Roles in Prostate Cancer Cell Deaths including Apoptosis, Anoikis, Entosis, Necrosis and Autophagic Cell Death. *Cancer Treat Rev*. 2014 February; 40(1): doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.008.
- 126.- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*. 2003; 57:205–25.
- 127.- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *The Prostate*. 1994; 24:114–8.
- 128.- Rokhlin OW, Taghiyev AF, Guseva NV, Glover RA, Chumakov PM, Kravchenko JE, et al. Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. *Oncogene*. 2005; 24:6773–84.
- 129.- Oh SJ, Erb HH, Hobisch A, Santer FR, Culig Z. Sorafenib decreases proliferation and induces apoptosis of prostate cancer cells by inhibition of the androgen receptor and Akt signaling pathways. *Endocrine-related cancer*. 2012; 19:305–19.
- 130.- Ma WL, Hsu CL, Yeh CC, Wu MH, Huang CK, Jeng LB, et al. Hepatic androgen receptor suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through modulation of cell migration and anoikis. *Hepatology*. 2012; 56:176–85.
- 131.- Chun J, Joo EJ, Kang M, Kim YS. Platycodin D induces anoikis and caspase-mediated apoptosis via p38 MAPK in AGS human gastric cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114:456–70.
- 132.- Wen, S.; Shang, Z.; Zhu, S.; Chang, C.; Niu, Y. Androgen receptor enhances entosis, a non-apoptotic cell death, through modulation of Rho/ROCK pathway in prostate cancer cells. *The Prostate*. 2013. Sep;73(12):1306-15.
- 133.- M Crespo, G van Dalum, R Ferraldeschi et al. Androgen receptor expression in circulating tumour cells from castration-resistant prostate cancer patients treated with novel endocrine agents. *Br J Cancer*. 2015 Mar 31; 112(7): 1166–1174.
- 134.- Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs

WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J (2014) AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 371(11): 1028–1038.

135.- Lo YM , Zhang J , Leung TN , Lau TK , Chang AM , Hjelm NM . Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma . *Am J Hum Genet* 1999 ; 64 : 218 – 24.

136.- Miyamoto DT, Sequist L V, Lee RJ. Circulating tumour cells-monitoring treatment response in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 11: 401-412.

137.- Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013; 133 : 346 – 56.

138.- Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Anker P, Herrera-Goepfert R, Medina-Velazquez LA, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS One* 2012 ; 7 : e52754.

139.- Alix-Panabières and Klaus Pantel. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. 2016. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1483.

140.- Heitzer E, Ulz P, Belic J , Gutsch S , Quehenberger F , Fischereder K, et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med* 2013; 5: 30.

141.- Azad AA , Volik SV , Wyatt AW , Haegert A , Le Bihan S , Bell RH , et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2315 – 24.

142.- Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov* 2013;3:1020–9.

143.- Brown P. The Cobas EGFR Mutation Test V2 assay. *Future Oncol.* 2016, 12, 451-2.

144.- Junker K, Heinzehman J, Beckhan C, Ochiya T, Jenster G. Extracellular vesicles and their role in urologic malignancies. *Eur Urol* 2016; 70:323-31.

145.- Del Re M, Biasco E, Crucitta S, Derosa L, Rofi E, Orlandini C, et al. The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *Eur Urol.* 2017 Apr;71(4): 680-687.

146.- Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1508–11.

- 147.- Welti J, Rodrigues DN, Sharp A, et al. Analytical validation and clinical qualification of a new immunohistochemical assay for androgen receptor splice variant-7 protein expression in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2016; 70: 599–608.
- 148.- Onstenk W, Sieuwerts AM, Kraan J, et al. Efficacy of cabazitaxel in castration-resistant prostate cancer is independent of the presence of AR-V7 in circulating tumor cells. *Eur Urol* 2015; 68: 939–45.
- 149.- Scher HI, Lu D, Schreiber NA, et al. Association of AR-V7 on circulating tumor cells as a treatment-specific biomarker with outcomes and survival in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2: 1441–9.
- 150.- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, et al : Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004. 10: 8152-8162.
- 151.- Meyer CP, Pantel K, Tennstedt P, Stroelin P, Schlomm T, Heinzer H, et al. Limited prognostic value of preoperative circulating tumor cells for early biochemical recurrence in patients with localized prostate cancer. *Urol Oncol*. 2016. May; 34(5): 235.e11-6
- 152.- Pal SK, He M, Wilson T, Liu X, Zhang K, Carmichael C, et al. Detection and phenotyping of circulating tumor cells in high-risk localized prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2015 Apr;13:130-6.
- 153.- Goodman OB Jr, Fink LM, Symanowski JT, Wong B, Grobaski B, Pomerantz D, et al. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18: 1904-1913.
- 154.- Serrano MJ, Garcia-Puche JL, Exposito J, Lorente JA. Circulating Tumor Cells (CTCs): From Detection to Dissection. *J Clin Diagnosis Res*. 2015; 3: 120.
- 155.- Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014; 33: 3140-3150.
- 156.- Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodríguez M, García-Puche JL, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012; 14: R71.
- 157.- Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/ neu tyrosine kinase. *Nat Med*. 1999; 5: 280-285.
- 158.- Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *Prostate*. 2006; 66: 1437-1444

- 159.- Gan Y, Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y. Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29: 4947-4958.
- 160.- Zhu M-L, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2010; 24: 769-777.
- 161.- Pignon J-C, Koopmansch B, Nolens G, Delacroix L, Waltregny D, Winkler R. Androgen receptor controls EGFR and ERBB2 gene expression at different levels in prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2009; 69: 2941-2949.
- 162.- Penney KL, Sinnott JA, Tyekucheva S, Gerke T, Shui IM, Kraft P, Sesso HD, Freedman ML, Loda M, Mucci LA, Stampfer MJ. Association of prostate cancer risk variants with gene expression in normal and tumor tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015; 24: 255-260.

**G.- PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA DERIVADA
DE ESTA TESIS:**

✚ 3 premios a nivel nacional:

1.- Premio *Pedro Cifuentes Díaz*, como Investigador Principal (IP) en el proyecto: ***Biopsia líquida para la estratificación del riesgo en cáncer de próstata. Análisis de subpoblaciones de células tumorales circulantes (CTCs) por citometría de masas (CyTOF).***

Ayuda a la Investigación dotada con 7500 euros
Fundación para la Investigación en Urología (FIU).
Asociación Española de urología (AEU).
Sevilla 10 Junio 2017.

2.- Primer premio a la mejor comunicación oral. ***La expresión del receptor de andrógeno en el tejido prostático se relaciona de forma directa con la presencia de células circulantes de tumor en el momento diagnóstico del cáncer de próstata.*** Puche Sanz I y cols. DOI:10.3315/pso.es.2sau.2016.

Primer premio a la mejor comunicación oral.
IV Simposio Proyecto Andrógeno-Urología
Zaragoza, 21 Octubre 2016.

3.- Segundo premio en el concurso de trabajos de investigación. ***CTCs como marcadores de respuesta en pacientes con CPRCm en tratamiento con abiraterona. Resultados preliminares de respuesta bioquímica vs citológica.*** Puche I, Mellado M, Vázquez F y cols. DOI:10.3252/pso.es.2sau.2014.

Segundo premio en el concurso de trabajos de investigación.
Proyecto Andrógeno.
II Simposio de Urología Janssen/Asociación Española de Urología.
Valencia 12 Diciembre 2014.

✚ 2 artículos en revistas internacionales con factor de impacto:

- **A comprehensive study of circulating tumour cells at the moment of prostate cancer diagnosis: biological and clinical implications of EGFR, AR and SNPs.** Puche-Sanz I, Alvarez-Cubero MJ, Pascual-Geler M, Rodríguez-Martínez A, Delgado-Rodríguez M, García-Puche JL, Expósito J, Robles-Fernández I, Entrala-Bernal C, Lorente JA, Cózar-Olmo JM, Serrano MJ. *Oncotarget*. 2017; 8:70472-70480

ISSN: 1949-2553
Factor de impacto 2016-17: **5.168**

- **Dormant Circulating Tumor Cells In Prostate Cancer: Biological, Clinical And Therapeutic Implications.** Álvarez Cubero MJ, Vázquez-Alonso F, Puche-Sanz I, Ortega FG, Martín-Prieto M, García-Puche JL, Pascual-Geler M, Lorente JA, Cozar-Olmo JM, Serrano MJ. *Curr Drug Targets* 2016;17(6):693-701.

ISSN: 1873-5592
Factor de impacto 2015-16: **3.59**

4 comunicaciones en congresos y foros internacionales:

- **A comprehensive study of circulating tumor cells at the momento of prostate cáncer diagnosis: biological and clinical implications of EGFR, AR and SNPs.** Pucho Sanz Ignacio, Alvarez Cubero M^a José. 1st Workshop based on liquid biopsy in Urology. 25th-26th May 2017. Granada. Spain.
- **Association between single nucleotide polymorphisms, gene expression and prostate cancer risk at the moment of diagnosis.** I. Pucho Sanz, I. Robles-Fernández, M. Pascual-Geler, L. Martínez-Gonzalez, J.A. Lorente, J.M. Cózar-Olmo, M.J. Álvarez-Cubero. 32nd Anual Congress of the European Association of Urology (EAU). 24-28th March 2017. London. United Kingdom.
- **Performance of circulating tumor cells in patients with clinical suspicion of prostate cancer: Biologic and clinical implications of EGFR, AR and SNPs.** Pucho-Sanz, Ignacio; Rodriguez-Martinez, Alba; Martín Way, David; Alvarez-Cubero, Maria José; Pascual-Geler, Manrique; Vázquez Alonso, Fernando; Robles-Fernandez, Inma; Serrano, Maria José; García-Pucho, José Luis; Cózar-Olmo. José Manuel. International Symposio. Precision Medicine based on liquid biopsy. From detection to dissection. 15-16th September 2016. Granada. Spain.
- **Phenotypic and molecular characterization of circulating tumor cells (EGFR and AR) and its correlation with prostate biopsy in early-stage prostate cáncer.** I. Pucho-Sanz, J.F. Flores-Martín, F. Vázquez-Alonso, M.J. Serrano-Fernández, J.M Cózar-Olmo. 31st Anual Congress of the European Association of Urology (AEU). 11-15th March 2016. Munich. Germany.

10 comunicaciones y pósters en congresos y foros nacionales:

- **Estudio de las CTCs en el momento diagnóstico del cáncer de próstata implicaciones clínicas y biológicas del EGFR, RA, y SNPs.** Pucho Sanz, I.; Rodríguez Martínez, A.; Martín Way, D.A.; Pascual Geler, M.; Vázquez Alonso, F.; Serrano Fernández, M.J.; Cozar Olmo, J.M. XXIX Congreso de la Asociación Andaluza de Urología. Córdoba. 13-14 Octubre 2016.
- **Papel potencial de las CTCs en el screening individual del cáncer de próstata.** Pucho Sanz I , Martín Way D, Rodríguez Martínez A, Pascual M, Vázquez F, Serrano MJ, Cózar Olmo JM. IV Simposio Proyecto Andrógeno-Urología. Zaragoza, 21 Octubre 2016.
- **La expresión del receptor de andrógeno en el tejido prostático se relaciona de forma directa con la presencia de células circulantes de tumor en el momento diagnóstico del cáncer de próstata.** Pucho Sanz I, Martín Way D, Rodríguez Martínez A, Pascual M, Vázquez F, Serrano MJ, Cózar Olmo JM. IV Simposio Proyecto Andrógeno-Urología. Zaragoza, 21 Octubre 2016.
- **Ánalisis de calidad de vida y efectos secundarios en pacientes con CPRC metastásico tratados con Abiraterona: experiencia en nuestro centro.** Barrabino Martín, R.; Vázquez Alonso, F.; Pucho Sanz, I.; la Iglesia Lozano, B.; Almonte Fernández, H.; Varilla Varilla, C.; Martín Way, D.A.; Simbaña García, J.J.; Orcera Herrera, V.; Cózar Olmo, J.M. Poster Virtual P-8, LXXXI Congreso Nacional de Urología, Toledo, 15-18 de Junio de 2016.
- **Acetato de abiraterona prequimioterapia para el tratamiento del CPRC metastásico: experiencia inicial.** Barrabino Martín, R.; Vázquez Alonso, F.; Pucho Sanz, I.; la Iglesia Lozano, B.; Flores Martín, J.F.; Almonte Fernández, H.; Varilla Varilla, C.; Cózar Olmo, J.M. Complejo Hospitalario Granada. Póster Virtual P-69, LXXX Congreso Nacional de Urología, Salamanca, 10-13 de Junio de 2015.
- **CTCs como marcadores de respuesta y predictores de supervivencia en pacientes con cprcm en tratamiento con abiraterona.** Pucho Sanz, I.; Mellado Martín-Prieto, M.; Flores Martín, J.F.; Vázquez

Alonso, F.; Serrano Fernández, M.J.; Cózar Olmo, J.M. Complejo Hospitalario Universitario de Granada y Centro Pfizer-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo). Póster Virtual P-63, LXXX Congreso Nacional de Urología, Salamanca, 10-13 de Junio de 2015.

- **Cuantificación de células tumorales circulantes en estadio inicial del cancer de prostata.** Puche Sanz, I.; Mellado Martín-Prieto, M.; Vázquez Alonso, F.; Flores Martín, J.F.; Serrano Fernández, M.J.; Cózar Olmo, J.M. Complejo Hospitalario Universitario de Granada y Centro Pfizer-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo). Póster Virtual P-13, LXXX Congreso Nacional de Urología, Salamanca, 10-13 de Junio de 2015.

- **Circulating tumor cells as a response biomarker in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. PSA VS CTC early response.** Puche Sanz, I; Mellado Martin, M; Vázquez Alonso, F; Flores Martín, JF; Serrano MJ; Cózar Olmo, JM. VI Rising Stars in Urology. Granada. 5 Marzo 2015.

- **CTCs como marcadores de respuesta en pacientes con CPRCm en tratamiento con abiraterona. resultados preliminares de respuesta bioquímica vs citológica.** Puche-Sanz I, Martín M, Vázquez-Alonso F, Flores-Martín J, Serrano-Fernández MJ, Cózar-Olmo JM. II Simposio Andrógeno Urología. Janssen. Valencia. 12-Diciembre 2014. DOI: 10.3252/pso.es.2sau.2014.

- **Implementación del tratamiento con abiraterona pre-quimioterapia en un Servicio de Urología.** Vázquez F; Flores JF; Puche I; Barrabino R; La Iglesia B; Almonte H; Varilla C; Martín DA; Simbaña JJ; Cózar JM. II Simposio Andrógeno Urología. Janssen. Valencia. 11-12-Diciembre 2014.

