



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA
FÍSICA

TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS, PRONÓSTICOS Y DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Inmaculada Robles Fernández

Directores de Tesis:

Jose Antonio Lorente Acosta

María Jesús Álvarez Cubero

Laura Vera Ramirez

Granada 25 de Mayo 2018



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

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Inmaculada Robles Fernández
ISBN: 978-84-9163-963-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52748>

La doctoranda / The doctoral candidate: **Inmaculada Robles Fernández** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor: **José Antonio Lorente Acosta, María Jesús Álvarez Cubero y Laura Vera Ramírez**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de 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.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publication have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, 25 de Mayo de 2018

Directores de Tesis / Thesis supervisor;

José Antonio Lorente Acosta

María Jesús Álvarez Cubero

Laura Vera Ramírez

Doctorando / Doctoral candidate:

Inmaculada Robles Fernández

Firmado / Signed

Firmado / Signed

CRITERIOS DE CALIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR CON MENCIÓN DE “DOCTOR INTERNACIONAL”:

1. Un artículo científico aceptado o publicado en una revista relevante en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el candidato, incluyendo parte de los resultados de la tesis.

Robles-Fernandez I, Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M, Cozar JM, Puche-Sanz I, Serrano MJ, Lorente JA, Alvarez-Cubero MJ. Association between polymorphisms in sex hormones synthesis and metabolism and prostate cancer aggressiveness. PLoS One. 2017 Oct 5;12(10):e0185447. Factor de impacto: 2,806 (Q1).

2. Una estancia internacional en un centro de investigación extranjero.

Periodo de tres meses en el *Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Center for Cancer Research, National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH), Bethesda (MD), EEUU.*

Esta estancia fue financiada por el “Programa de Movilidad Internacional De Estudiantes De Doctorado UGR-CEI BIOTIC”

Desde Septiembre a Noviembre de 2014

ÍNDICE

RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	21
ABREVIATURAS.....	27
INTRODUCCIÓN.....	33
1. LA PRÓSTATA.....	35
1.1 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA.....	35
2. CÁNCER DE PRÓSTATA.....	37
2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	38
2.2. FACTORES DE RIESGO.....	40
2.2.1 Exógenos.....	40
2.2.2. Endógenos.....	42
2.3. CLÍNICA.....	44
2.3.1 Cribado y diagnóstico.....	44
2.3.1.1. Test de PSA.....	45
2.3.1.2. Examen digital rectal (DRE).....	47
2.3.1.3. Biopsia de próstata.....	47
2.4. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	48
2.4.1. Sistema de Puntuación de Gleason.....	48
2.4.2. Estadificación TNM.....	49
2.4.3. Clasificación en Grupos de Riesgo D'Amico.....	51
2.5. TRATAMIENTO.....	51
3. HORMONAS SEXUALES Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	53
3.1 ANDRÓGENOS.....	53
3.2 ESTRÓGENOS.....	55
4. NUEVOS BIOMARCADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA.....	57
4.1. SNPs.....	57
4.1.1. Generalidades.....	57
4.1.2. SNPs en el Cáncer de Próstata.....	58
4.1.2.1 SNPs en genes de la síntesis y metabolismo de los esteroides sexuales.....	60
4.1.3. Genes y SNPs estudiados.....	63
4.2. MicroRNAs.....	72
4.2.1. Síntesis y mecanismo de acción.....	72
4.2.2 Alteración de la expresión de miRNAs en el cáncer.....	74
4.2.3. Papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer de próstata.....	75

4.2.4. miRNAs como biomarcadores en el cáncer de próstata.....	77
4.2.4.1. miR-141 y miR-375	79
4.2.4.2. Controles endógenos para el estudio de miRNAs en cáncer de próstata.....	80
HIPÓTESIS.....	83
OBJETIVOS	87
MATERIALES Y MÉTODOS	91
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	93
2. TIPO DE MUESTRAS	94
3. ANÁLISIS DE SNPs	95
3.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica	95
3.2. Genotipado mediante sondas <i>TaqMan</i> [®] <i>MGB</i>	95
3.3 Validación del Genotipado por Secuenciación	98
3.3.1 Amplificación.....	98
3.3.2 Purificación	100
3.3.3 Secuenciación Sanger.....	100
3.3.3.1 Electroforesis capilar.....	100
3.4. Tratamiento estadístico de los resultados	101
4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs.....	104
4.1. Extracción de ARN	104
4.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	104
4.2.1. Retrotranscripción	105
4.2.1. Amplificación por qPCR.....	105
4.3. Identificación del control endógeno adecuado.....	108
4.4. Tratamiento estadístico de los resultados	108
4.4.1. Normalización de los valores de expresión	108
4.4.2. Análisis de asociación con las variables clínicas y supervivencia de los pacientes	109
RESULTADOS.....	111
1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE SNPS CON LA PRESENCIA TUMORAL Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA	113
1.1. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG (HWE)	113
1.2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	114
1.3. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	115
1.4. ESTUDIO CASO-CONTROL.....	117
1.5. ESTUDIO CASO-CASO	118

1.5.1. Estudio de asociación con las variables clínicas de los pacientes	118
1.5.2. Estudio de asociación haplotípica	122
1.5.3. Análisis de supervivencia.....	123
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA	125
2. 1. IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL ENDÓGENO ADECUADO.....	125
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	126
2.3. IDENTIFICACIÓN DE MIRNAS ASOCIADOS CON VARIABLES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	127
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES	145
CONCLUSIONS	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXOS.....	169
PROTOSCOLOS.....	171
ARTÍCULO ORIGINAL	173
PUBLICACIONES ADICIONALES OBTENIDAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS	185
TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS	187

RESUMEN

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y su incidencia va en aumento. El test de PSA continúa siendo la principal herramienta empleada en el cribado del PCa a pesar de su falta de especificidad y precisión, lo que conlleva la realización de biopsias innecesarias. Por otra parte, el PCa es una enfermedad biológicamente heterogénea que cursa con diferentes grados de agresividad, pero las características que definen el PCa como estadio clínico (estadío TNM), el grado tumoral (puntuación de Gleason) y el nivel de PSA, no son adecuadas para distinguir con precisión los tumores indolentes de los tumores agresivos. Todo esto provoca, en muchos casos, un sobretreatmento de tumores poco agresivos que acarrearán efectos secundarios y un sobrecoste, igualmente innecesarios. Además estos marcadores tampoco son capaces de predecir la respuesta a un tratamiento.

Por lo que a día de hoy uno de los principales retos es identificar biomarcadores específicos que permitan a los clínicos detectar la enfermedad en un estadio temprano, redefinir la estratificación en grupos de riesgo y predecir el curso de la enfermedad.

Estudios epidemiológicos han sugerido la combinación de un componente ambiental y un componente genético en el PCa. El desarrollo de técnicas de análisis genético en la última década ha permitido la identificación de variantes genéticas comunes en el ADN germinal que se asocian de forma significativa con susceptibilidad al PCa y la agresividad. Del mismo modo, los recientes avances tecnológicos han revelado el papel que juegan los miRNAs en la regulación de la expresión génica y su desregulación en PCa. Los patrones de expresión de miRNAs parecen reflejar el estado de diferenciación del tumor y su evolución, por lo que se presentan como potenciales biomarcadores en el PCa.

La incorporación de estas variantes genéticas y de miRNAs a la práctica clínica habitual podría mejorar la precisión del diagnóstico, pronóstico y predicción en el PCa. No obstante, los resultados de los estudios hasta la fecha arrojan datos contradictorios, lo que dificulta dicha incorporación. Nuevos estudios son necesarios para clarificar su rol en el PCa.

Debido a la importancia de los andrógenos y estrógenos en la próstata y su desregulación en el PCa, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la posible relación entre variantes germinales de nucleótido simple (SNPs) en genes que participan en la síntesis y metabolismo esteroides sexuales y el riesgo y agresividad en

pacientes con PCa. Los genes seleccionados y variantes fueron: AR (rs6152, rs9332969); CYP17A1 (rs7437572, rs6162, rs6163, rs1004467); LHCGR (rs2293275), ESR1 (rs1062577) y ERS2 (rs1256049).

Para ello se incluyeron 311 individuos sospechosos de PCa con nivel de PSA >4 ng/ml e indicación de biopsia prostática diagnóstica. De ellos 155 tuvieron una biopsia negativa y pasaron a formar parte del grupo control; y 156 tuvieron una biopsia positiva constituyendo el grupo de pacientes con PCa. Se recogió información clínica relevante en el grupo de pacientes y se les hizo un seguimiento durante 54 meses para determinar la respuesta al tratamiento.

Ninguno de los SNPs analizados en sangre, mostró diferencias significativas entre pacientes con PCa y controles. Sin embargo, al centrar el estudio en los pacientes, diferentes variantes genéticas se asociaron con características de PCa agresivo.

Los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163, todos ellos pertenecientes al gen CYP17A1, se relacionaron con valores de PSA > 10 ng/ml y con un riesgo D'Amico intermedio y alto. Además el rs6163 se asoció con un menor tiempo libre de recurrencia bioquímica en aquellos pacientes sometidos a prostatectomía radical. Así mismo el rs2293275 ubicado en el gen LHCGR mostró una tendencia de asociación con estadios localmente avanzados y avanzados.

Por otra parte, en esta Tesis Doctoral estudiamos el patrón de expresión de varios miRNAs relacionados con procesos como la proliferación celular y la transición epitelio-mesénquima, previamente asociados a presencia tumoral y progresión hacia cáncer de próstata resistente a la castración. En concreto, nuestro objetivo fue analizar la expresión de los miR-141 y miR-375 en tejido de biopsia de próstata y su posible asociación con la agresividad en pacientes con PCa.

Para este estudio se incluyeron 131 pacientes con PCa de los 156 incluidos en el estudio de SNPs. Por lo tanto, tuvimos igualmente información acerca de las variables clínicas y la respuesta al tratamiento tras 54 meses de seguimiento.

En primer lugar se evaluó el gen normalizador más apropiado entre los candidatos GAPDH, RNU6B y miR-130b, siendo el RNU6B elegido por su mayor estabilidad.

Descartado el miR-130b como normalizador, se analizó la posible asociación con las variables clínicas de los pacientes de PCa ya que previamente se ha propuesto como miRNA supresor de tumores.

Ninguno de los tres miRNAs finalmente analizados (miR-14, miR-375 y miR-130b) mostró una asociación estadísticamente significativa con las variables clínicas de los pacientes (PSA, Gleason, estadio T y riesgo D'Amico), ni con el tiempo libre de recurrencia bioquímica.

Por todo ello, nuestros estudios sugieren por un lado, una relación de variantes genéticas específicas de los genes CYP17A1 y LHCGR con la agresividad en el PCa y por el otro, la falta de un patrón de expresión diferencial de los miRNAs 141, 375 y 130b en el tejido tumoral entre los diferentes grupos de pacientes con PCa.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most frequently cancer diagnosed in men and its incidence is increasing. The PSA test continues to be the main tool used in the screening of the PCa despite its lack of specificity and precision, which leads to the performance of unnecessary biopsies. On the other hand, PCa is a biologically heterogeneous disease with different degrees of aggressiveness. However, PCa clinical parameters which defines the disease, as clinical stage (TNM), tumor grade (Gleason score) and PSA level are not adequate to distinguish indolent tumors from aggressive tumors. This is one of the reasons about many cases have an overtreatment of non-aggressive tumors causing unnecessary side effects and an additional costs. Furthermore, these markers are also not able to predict a treatment response.

So, today one of the main challenges is to identify specific biomarkers allowing clinicians to detect an early stage disease, redefine risk stratification and predict the disease course.

Epidemiological studies have suggested the combination of both, environmental and genetic components in PCa. The development in the last decade of novel techniques in genetic analysis has allowed the identification of common genetic variants in germinal DNA; which are significantly associated with PCa susceptibility and aggressiveness. In the same way, recent technological advances have revealed the role of miRNAs in the regulation of gene expression and its deregulation in PCa. The miRNAs expression patterns seem to reflect the state of tumor differentiation and evolution, so they are presented as PCa potential biomarkers.

The incorporation of these genetic variants and miRNAs into routine clinical practice could improve the accuracy of diagnosis, prognosis and prediction in PCa. However, to date there are contradictory data which make difficult its incorporation in clinical practice. New studies are needed to clarify their role in PCa.

Due to the importance of androgens and estrogens in prostate gland and its deregulation in PCa, we focused on this aim one of the objectives of this PhD. Analyzing the relationship between germline variants of simple nucleotide (SNPs) in genes involved in the sex steroid synthesis and metabolism with PCa risk and aggressiveness. The selected genes and variants were: AR (rs6152, rs9332969); CYP17A1 (rs7437572, rs6162, rs6163, rs1004467); LHCGR (rs2293275), ESR1 (rs1062577) and ERS2 (rs1256049).

ABSTRACT

311 individuals with a PCa suspicion, with PSA level > 4 ng / ml and indication for a diagnostic prostatic biopsy were included. Of these, 155 had a negative biopsy and became part of the control group; and 156 had a positive biopsy constituting the group of PCa patients. Relevant clinical information was collected in the group of patients and followed up for 54 months to determine the treatment response.

None of the analyzed SNPs in blood showed significant differences between PCa controls and patients. However, when we focused the study on patients, different genetic variants were associated with aggressive PCa characteristics.

The SNPs rs743572, rs6162 and rs6163 (CYP17A1 gene) were associated with PSA values > 10 ng / ml and with intermediate and high D'Amico risk. In addition, rs6163 was associated with a shorter time of free biochemical recurrence (in those patients undergoing radical prostatectomy). Likewise, rs2293275 (LHCGR gene) showed a tendency to be associated to locally advanced and advanced stages.

On the other hand, in this PhD we studied the expression pattern of several miRNAs with relevance in processes such as cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition. These miRNAs were previously associated with tumor presence and progression to castration resistant prostate cancer. Specifically, our objective was to analyze the expression of miR-141 and miR-375 in prostate biopsy tissue and its possible association with aggressiveness in PCa patients. For this analysis, 131 PCa patients were included. Therefore, we had also information about the clinical variables and response to treatment after 54 months of follow-up.

Firstly, we have evaluated the most appropriated housekeeping gene among GAPDH, RNU6B and miR-130b candidates ones, chosen RNU6B for its greater stability. For this reason, miR-130b was included as another miRNA to be analyzed for its several associations with PCa clinical variables as tumor suppressor role.

However, none of the three analyzed miRNAs (miR-14, miR-375 and miR-130b) showed any statistically significant associations with clinical parameters in patients (PSA, Gleason, T staging and D'Amico risk) or with the free time of biochemical recurrence.

For all these reasons, our studies suggest:

On the one hand, there is a relationship of CYP17A1 and LHCGR specific genetic variants with PCa aggressiveness.

On the other, the inexistence of 141, 375 and 130b miRNAs differential expression patterns in tumor tissue between the different PCa groups of patients.

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADT	Terapia de privación androgénica (del inglés <i>Androgen Deprivation Therapy</i>)
AEU	Asociación Europea de Urología
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Receptor de andrógenos (del inglés <i>Androgen Receptor</i>)
AREs	Elementos de respuesta a andrógenos (del inglés <i>Androgen Response Elements</i>)
ARNm	ARN mensajero
cPSA	PSA complejo (del inglés <i>complexed PSA</i>)
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración (del inglés <i>Castration-Resistant Prostate Cancer</i>)
Ct	Ciclo umbral (del inglés <i>Cycle threshold</i>)
CTD	Dominio C-terminal (del inglés <i>C-Terminal Domain</i>)
CV	Coefficiente de variación
CYP11A1	Citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipéptido 1
CYP17A1	Citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1
CYP19A1	citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1
DBD	Dominio de unión al ADN (del inglés <i>DNA-Binding Domain</i>)
DE	Desviación estándar
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona sulfato
DHT	Dihidrotestosterona
DMBA	7,12-dimetil-1,2-benzatraceno
DRE	Examen digital rectal (del inglés <i>Digital Rectal Examination</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EMT	Transición epitelio-mesénquima (del inglés <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
ER	Receptor de estrógenos (del inglés <i>Estrogen Receptor</i>)
EREs	elementos de respuesta a estrógenos (del inglés <i>Estrogen Response</i>)

ABREVIATURAS

	<i>Elements</i>)
fPSA	PSA libre (del inglés <i>free PSA</i>)
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (del inglés <i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (del inglés <i>Genome-Wide Association Study</i>)
H&E	Hematoxilina & eosina
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HWE	Equilibrio de Hardy–Weinberg (del inglés <i>Hardy–Weinberg Equilibrium</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1 (del inglés <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>)
kDa	Kilodaltons
LBD	Dominio de unión a ligando (del inglés <i>Ligand Binding Domain</i>)
LD	Desequilibrio de ligamiento (del inglés <i>Linkage Disequilibrium</i>)
LH	Hormona luteinizante (del inglés <i>Luteinizing Hormone</i>)
LHCGR	Receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina (del inglés <i>Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor</i>)
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante (del inglés <i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i>)
LRRD	Dominio de repetición rico en leucina (del inglés <i>Leucine-Rich Repeat Domain</i>)
mCRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (del inglés <i>metastatic CRPC</i>)
miRNA	microARN (del inglés <i>microRNA</i>)
ml	Mililitro
n.a	No aplicable
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (del inglés <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)

ng	Nanogramo
NLS	Señal de localización nuclear (del inglés <i>Nuclear Localization Signal</i>)
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol
nSNP	SNP no sinónimo
NTC	Control negativo (del inglés <i>Non Template Control</i>)
NTD	Dominio N-terminal (del inglés <i>N-Terminal Domain</i>)
OR	Odds ratio
OS	Supervivencia global (del inglés <i>Overall Survival</i>)
Pb	Pares de bases
PCa	Cáncer de próstata (del inglés <i>Prostate Cancer</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFS	Supervivencia libre de recaída (del inglés <i>Progression-free survival</i>)
Poly-A	Poliadenilación
PSA	Antígeno prostático específico (del inglés <i>Prostate Specific Antigen</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (del inglés <i>quantitative PCR</i>)
RNasa	Enzima ribonucleasa
snRNA	RNAs nucleolar pequeño (del inglés <i>small nuclear RNA</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa (del inglés <i>quantitative Reverse Transcription PCR</i>)
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales (del inglés <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SRD5A2	Esteroido 5- α -reductasa 2 (del inglés <i>Steroid 5 Alpha-Reductase 2</i>)
sSNP	SNP sinónimo
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptor</i>)
TM	Temperatura de Melting

ABREVIATURAS

UTR	Región no traducida (del inglés <i>Untranslated Region</i>)
μl	Microlitro
3 β HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ -5-4 isomerasa
17 β HSD 3,5	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, subtipos 3 y 5

INTRODUCCIÓN

1. LA PRÓSTATA

1.1 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

La próstata es una glándula que forma parte del aparato urogenital masculino. Se trata de una glándula interna, compacta y con forma de nuez que se ubica en la región pélvica entre el pubis y el recto, debajo de la vejiga, y que se encuentra atravesada por la primera parte de la uretra, conducto encargado de transportar la orina desde la vejiga hasta el pene para su salida al exterior con la micción (Figura 1)¹. Su tamaño experimenta cambios con la edad, siendo el tamaño normal para un adulto de 25-30 años de 3 cm de ancho por 4 cm de largo y unos 20 gramos de peso².

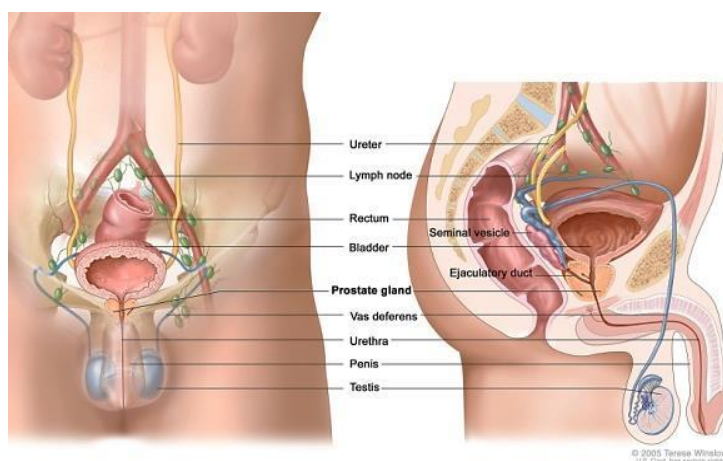


Figura 1. Ubicación de la próstata en el cuerpo. (*Prostate Cancer Treatment (PDQ®)– Health Professional Version. NCI*).

Según el modelo de *McNeal*³, anatómicamente la próstata se divide en cuatro zonas distintas: una zona central; una zona de transición; una zona periférica y una zona anterior (Figura 2); todas ellas diferenciadas por su tamaño, composición y el tipo de las patologías que les afectan.

La zona central ocupa el 25% de la próstata, situándose en la zona posterior superior de la glándula; contiene el ducto eyaculatorio proveniente de la vesícula seminal que se une con la uretra y es la zona más resistente a las enfermedades. Por su parte, la zona periférica es la de mayor tamaño (supone el 70% del tamaño total de la próstata), se sitúa en la parte posterior inferior de la próstata y es la región más propensa a sufrir patologías. En ella tienen lugar la mayor parte de las prostatitis y los carcinomas de

próstata (hasta el 70% de ellos). La zona de transición es la más pequeña de todas (ocupa el 5% de la glándula), se sitúa entre las zonas central y periférica; está formada por dos lóbulos que envuelven a la uretra y en ella tienen lugar la mayor parte de las hiperplasias benignas de próstata (HBP) y un 25% aproximadamente de los carcinomas de próstata. Por último, la zona anterior o estroma fibromuscular, se localiza en la parte anterior, está formada por fibras musculares lisas y no contiene estructuras glandulares ¹.

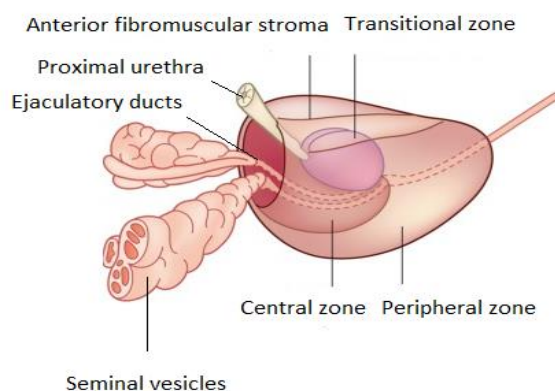


Figura 2. Anatomía de la próstata. Adaptación de *Harvey C J, et al. Br J Radiol. 2012.*

El desarrollo de la próstata comienza en el tercer mes del desarrollo embrionario a partir de invaginaciones epiteliales del seno urogenital posterior debido a la acción ejercida por los andrógenos producidos en los testículos fetales ¹. Está formada principalmente por elementos glandulares (70%) y elementos estromales (30%). Su límite está definido por una envoltura denominada cápsula prostática formada en su parte externa por colágeno y en la interna por fibras de músculo liso que se introducen hacia el interior de la glándula en forma de septos. El tejido glandular se organiza en 3 grupos de glándulas dispuestas alrededor de la uretra que desde dentro hacia afuera se conocen como glándulas mucosas, glándulas submucosas y glándulas principales ⁴. En la región periférica de la próstata el tejido glandular está formado por acinos de epitelio simple, mientras que la parte central está formada por ductos que forman estructuras ramificadas que vierten la secreción prostática a la uretra.

La secreción prostática producida en la próstata forma parte del plasma seminal junto con el fluido seminal producido en las vesículas seminales y la secreción producida en

las glándulas bulbouretrales. La unión del plasma seminal a los espermatozoides producidos en los testículos, constituye el semen ⁵.

La secreción prostática supone unos 0.5ml de los aproximadamente 3ml de semen que se liberan en una eyaculación normal. Se trata un líquido lechoso, de pH ligeramente alcalino constituido por proteasas, lípidos, iones metálicos y poliaminas que cumplen diferentes funciones. Entre estos diferentes elementos que los componen cabe destacar la fibrinolisisina y el antígeno prostático específico (PSA) que participan en la licuación del semen una vez éste es depositado en la vagina para liberar a los espermatozoides; la fosfatasa ácida prostática que permite la nutrición de los espermatozoides o el zinc que actúa como agente antibacteriano ⁶. Por lo tanto, la secreción prostática contribuye a mantener la viabilidad de los espermatozoides y les proporciona un vehículo de transporte. Además, la próstata protege a las vías urinarias contra las infecciones y colabora en la emisión de la eyaculación y en el control de la orina durante la misma, para evitar su salida a través de la uretra ².

2. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (PCa) es una enfermedad maligna que se caracteriza por un crecimiento incontrolado de las células prostáticas. En más del 95% de los casos se desarrolla en las células epiteliales de la glándula y recibe el nombre de adenocarcinoma de próstata ⁷ (Figura 3).

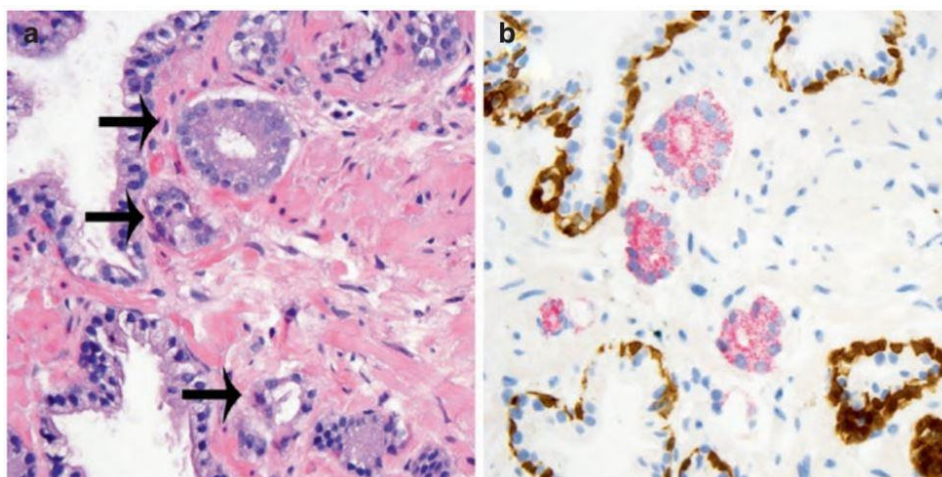


Figura 3. Morfología del PCa. a) Corte histológico de tejido prostático teñido con H&E. El PCa se caracteriza histológicamente por una arquitectura y citología anormal. Las pequeñas glándulas circulares indicadas por las flechas representan las glándulas cancerígenas. A nivel citológico estas glándulas tienen un citoplasma más abundante y más anfófilico, así como un nucléolo prominente. Con respecto a la arquitectura, las glándulas cancerígenas son más pequeñas que las glándulas benignas circundantes y tienen bordes luminales nítidos. b) Mismo tejido teñido inmunohistológicamente usando un cóctel de anticuerpos. (*Robinson et al. Springer. 2018*).

2.1. EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial el PCa es el segundo tipo de cáncer más común en los hombres y el más frecuentemente diagnosticado entre hombres en países desarrollados. En 2012 se diagnosticaron 1.1 millones de nuevos casos, lo que representa el 15% del total de cánceres ⁸.

Si miramos las tasas de los últimos 10 años (presentadas por GLOBOCAN en el año 2012), podemos observar que hay un incremento progresivo en la incidencia de esta enfermedad, especialmente en los países desarrollados a lo largo de las zonas de Norteamérica, norte y oeste de Europa y Oceanía, lo cual es debido a diversos factores como el envejecimiento de la población, la inclusión de sistemas de detección precoz y los hábitos de vida (Figura 4a).

Por el contrario las tasas de muerte son mayores en países menos desarrollados que se encuentran en zonas de Sudamérica, el África subsahariana y el Caribe, ocasionadas por el diagnóstico en etapas más avanzadas, el acceso a los fármacos y a factores genéticos (Figura 4b). En 2012 el PCa causó 307.000 muertes, lo que representan el 6.6% de las muertes en hombres debidas a un cáncer (quinto tipo) ⁸.

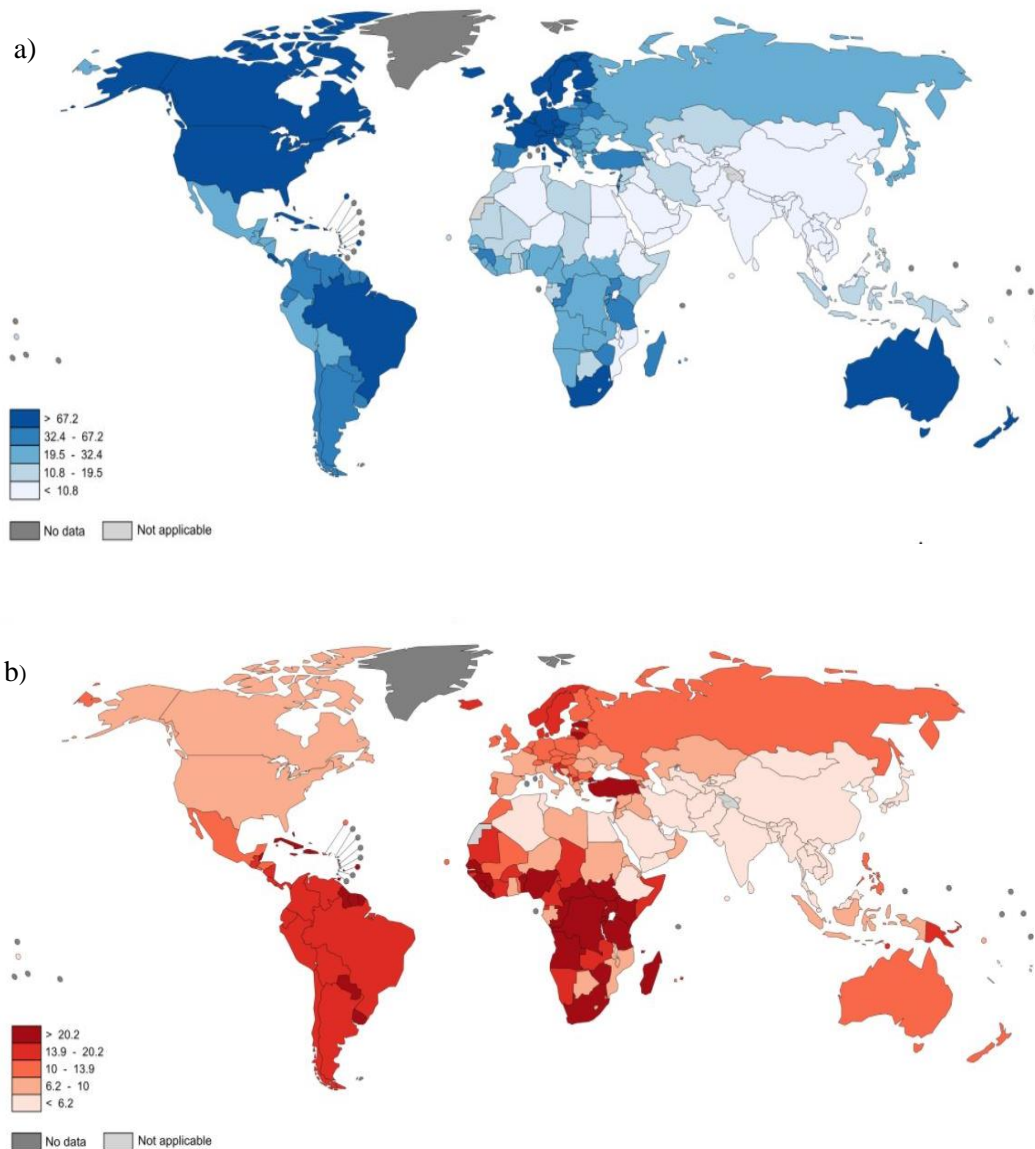


Figura 4. Estimación de la incidencia (a) y la mortalidad (b) del PCa en el mundo por cada 100.000 hombres (ajustadas a la edad). GLOBOCAN 2012.

Si nos fijamos en España, nuestro país sigue las tendencias de otros países desarrollados con un incremento en las tasas de incidencia y un descenso en las tasas de mortalidad (Figura 5). En 2012 se diagnosticaron más de 27.800 nuevos casos que representan el 21% del total de tumores diagnosticados, siendo el tipo de cáncer más frecuente en hombres. Con unas 5.400 muertes, que representan un 8.62% del total de fallecimientos por cáncer en varones, fue el tercer tipo de cáncer con más mortalidad ^{8,9}.

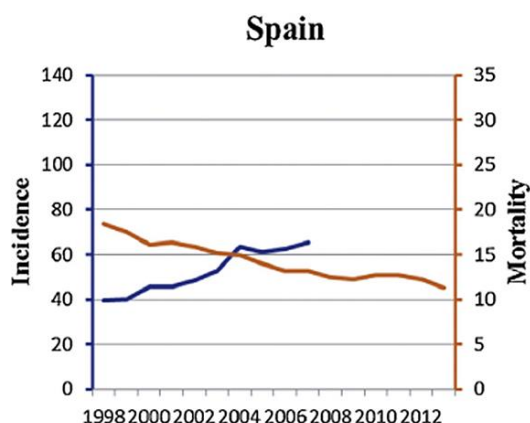


Figura 5. Tendencias de incidencia y mortalidad del PCa en España por cada 100.000 hombres (ajustada a la edad). La línea azul representa la incidencia y la línea roja la mortalidad. (Wong MCS, et al. Eur Urol. 2016).

La supervivencia global (OS) a los cinco años es del 95% aproximadamente sin tener en cuenta factores como la edad del paciente, el tipo histológico o el estadio tumoral en el momento del diagnóstico, que determinan entre otros la elección del tratamiento.

Si tenemos en cuenta el estadio, para tumores localizados (estadios I y II) y localmente avanzados (estadio III y IV sin diseminación distante) las tasas de supervivencia a cinco años se mantienen, pero bajan hasta el 30% para pacientes con tumores diseminados a otras partes del cuerpo ¹⁰.

2.2. FACTORES DE RIESGO

A pesar de que no se conoce con exactitud la/s causa/s que desencadenan el PCa, la edad, el nivel hormonal, la nutrición, la herencia o el estilo de vida parecen influir en el desarrollo de la enfermedad.

2.2.1 Exógenos

- **Dieta:** diversos estudios han sugerido una relación entre la dieta, la incidencia y progresión del PCa. La ingesta de carne roja y grasa podrían incrementar el riesgo de PCa, mientras que el consumo de frutas, vegetales y polifenoles podría disminuirlo ¹¹. Si hacemos un análisis por grupos de nutrientes, ingestas altas de carbohidratos parecen aumentar el crecimiento de las células tumorales prostáticas y se asocian con un mayor riesgo de PCa ¹². Los estudios acerca de la relación entre la ingesta total de grasas y la incidencia de PCa han mostrado resultados heterogéneos, ya que mientras unos autores han hallado una asociación entre ambos, otros no. Además de la ingesta

total también se ha estudiado la relación entre el tipo de grasa y el PCa, así la ingesta de grasas saturadas se ha relacionado con un incremento de PCa ¹¹. Con respecto a las grasas poliinsaturadas, los resultados son igualmente conflictivos pues si bien el ácido graso poliinsaturado omega-6 (lo encontramos en el aceite de maíz) podría incrementar el riesgo por su acción inflamatoria y proliferativa, el ácido graso poliinsaturado omega-3 (se encuentra principalmente en el pescado azul) a pesar de que se le ha atribuido una acción antiinflamatoria y antiproliferativa, su consumo ha sido asociado tanto con un incremento como una reducción del riesgo de PCa ¹². Por su parte el colesterol se ha asociado a un mayor riesgo de PCa, debido a que favorece la inflamación y la esteroidogénesis en el tumor. Así mismo, las isoflavonas de la soja, el licopeno del tomate y los polifenoles antioxidantes del té verde podrían reducir el riesgo de PCa y la progresión tumoral ¹².

- Obesidad: la obesidad, definida por la Organización Mundial de la Salud como un índice de masa corporal mayor de 30 kg/m², se asocia a un mayor riesgo y un mayor grado de PCa ¹³. A nivel molecular esta relación podría deberse a una alteración del eje insulina/IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico 1); a una alteración de los niveles de hormonas sexuales y/o a una alteración del metabolismo de las adipocinas. En obesidad aumentan los niveles de insulina en el suero, ésta tiene acción mitótica y favorece la síntesis hepática de IGF-1 que previene la apoptosis e induce la formación de nuevos vasos circulatorios. Además los altos niveles de insulina en suero inhiben la síntesis hepática de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), una proteína que se une a la testosterona en el suero, impidiendo que ésta sea biológicamente activa. El incremento de testosterona activa disminuye la síntesis de testosterona en los testículos por un mecanismo de retroalimentación negativa. Por otra parte, se incrementan los niveles séricos de leptina, hormona que promueve la angiogénesis y disminuyen los niveles de adiponectina, la cual inhibe el crecimiento celular ¹³.

Sin embargo, diferentes estudios apoyan la idea de que no hay causas biológicas que expliquen asociación entre la obesidad, el riesgo y la agresividad en el PCa, si no que las personas obesas tienen menos probabilidad de ser diagnosticadas de PCa en estadio precoz debido a que disminuye la precisión de las herramientas diagnósticas empleadas. En pacientes obesos se puede producir una hemodilución del PSA y el

valor predictivo del examen digital rectal (DRE) puede disminuir por la mayor cantidad de tejido adiposo. Además se puede reducir la probabilidad de encontrar el tumor en la biopsia en próstatas de mayor tamaño que presentan los pacientes con obesidad ¹⁴.

En contraposición, la actividad física es recomendable para la prevención del PCa. Estudios preclínicos han sugerido que el ejercicio puede modular el desarrollo tumoral mediante la alteración del estrés oxidativo. Además, estudios epidemiológicos y datos clínicos han mostrado que mayores niveles de ejercicio físico mejoran las respuestas al PCa ¹⁵.

- Tabaco: a pesar de que se estima que el tabaco provoca hasta el 30% de los cánceres en el mundo, no hay una asociación clara entre el tabaco y riesgo de padecer PCa ¹⁶. En un meta-análisis con una cohorte de 24 estudios, no se halló una asociación significativa entre fumar y una mayor incidencia de PCa, pero entre los pacientes fumadores aquellos que fumaban más cigarrillos al día/año mostraron un mayor riesgo que aquellos que fumaban menos ¹⁷. Por el contrario sí parece existir una asociación entre el tabaco y la agresividad y mortalidad en el PCa, directamente proporcional a la intensidad y duración ^{17,18}.
- Exposición ocupacional: una gran variedad de ocupaciones y exposiciones ambientales ocupacionales han sido asociadas con el PCa en estudios epidemiológicos, aunque con resultados inconsistentes. Ocupaciones como la agricultura, la metalurgia y la industria del caucho con exposiciones a herbicidas y pesticidas, cadmio, hidrocarburos aromáticos policíclicos y las emisiones del motor han sido asociadas con un incremento de PCa ¹⁹.

2.2.2. Endógenos

- Edad: La incidencia del PCa aumenta a medida que aumenta la edad. Su diagnóstico es raro en hombres menores de 44 años, pero a partir de esta edad su incidencia se incrementa. Según los datos recogidos en EEUU entre 2009 y 2013, tan solo un 0.6% de los casos se diagnosticaron en pacientes menores de 44 años, mientras que el 9.5% de los pacientes diagnosticados tenían entre 45 y 54 años. Para hombres con

edades comprendidas entre los 55 y 64 años el porcentaje de diagnóstico se incrementó hasta el 32.9%. El mayor porcentaje de diagnóstico se dio en hombres entre 65 y 74 años de edad (37.6% de los casos). A partir de los 75 años la incidencia descendió, suponiendo el 15.5% de los diagnósticos, hasta bajar al 3.8% en pacientes con más de 84 años ¹⁰.

- Niveles hormonales: El envejecimiento en los hombres va acompañado de una progresiva disminución variable en la producción de testosterona sérica, especialmente a partir de los 40 años. Se ha sugerido que en cierta medida la próstata puede mantener los niveles funcionales intra-prostáticos de andrógenos incrementando la expresión del receptor de andrógenos y de las enzimas que implicadas en la biosíntesis de andrógenos. Pero estos mecanismos de adaptación podrían intensificarse con la edad llegando a alcanzar el límite de capacidad compensatoria, lo cual podría incrementar las tasas de mutación y procesos de evolución maligna en las células prostáticas ²⁰.
- Origen étnico: Los hombres de origen africano tienen un mayor riesgo de desarrollar PCa como así lo reflejan los estudios estadísticos del programa SEER (*The Surveillance, Epidemiology, and End Results*) del NCI (*National Cancer Institute*) de EEUU ¹⁰. Les siguen los caucásicos y a corta distancia los hispanos. Las incidencias más bajas se dan en hombres con origen asiático y en los nativos de Alaska e indios americanos. Pero además los hombres de origen africano tienen mayores tasas de muerte frente a otras poblaciones. (Figura 6).

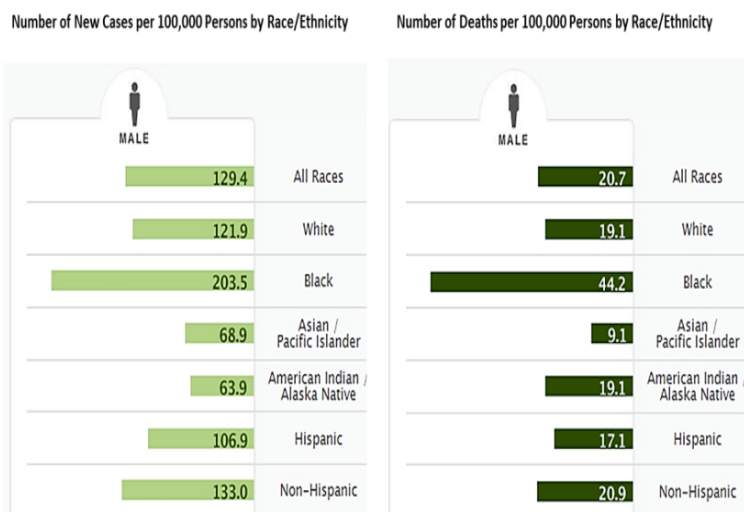


Figura 6. Tasas de incidencia y mortalidad para las distintas poblaciones en EEUU (ajustadas a la edad). (*The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program of the NCI*).

- **Historia Familiar:** Una historia de PCa familiar supone tener más del doble de riesgo de padecer PCa. El riesgo varía según el grado de parentesco con las personas afectadas. Así para un hombre con un familiar de primer grado (padre, hermano o hijo) diagnosticado con PCa el riesgo es mayor que para un hombre con un familiar de segundo grado afectado: tienen 2.22 veces y 1.88 veces más riesgo respectivamente de desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida que un hombre sin historia familiar. Los estudios en gemelos han proporcionado evidencias consistentes del factor hereditario del PCa, pues se ha estimado una concordancia del 21% entre pares de gemelos monocigóticos y un 6% en gemelos dicigóticos para PCa ²¹.

En resumen, se estima que un 60% aproximadamente de los PCa se deben a factores ambientales y/o al estilo de vida, mientras que el 40% restante se debe a factores genéticos hereditarios ²².

2.3. CLÍNICA

El PCa es una enfermedad de crecimiento lento y dirigido por hormonas que puede cursar sin síntomas, especialmente en las etapas iniciales debido a que el cáncer suele desarrollarse en la zona periférica de la glándula prostática, la más alejada de la uretra. En etapas más avanzadas de la enfermedad el crecimiento del tumor puede afectar a la uretra y provocar síntomas del tracto urinario inferior como polaquiuria (necesidad de orinar con frecuencia); nocturia (necesidad de orinar frecuentemente durante la noche); dificultad de retener o iniciar la micción; dolor durante la micción; flujo de orina débil así como disfunción eréctil, dolor durante la eyaculación; disminución del volumen eyaculado; hematuria (sangre en la orina) y/o hemospermia (sangre en el semen) y dolor o rigidez en la parte inferior de la espalda, en las caderas, en la pelvis y/o en los muslos. Estos síntomas no son exclusivos del PCa pues pueden aparecer también en el curso de otras patologías de la próstata como la HBP o la prostatitis ²³.

2.3.1 Cribado y diagnóstico

Un correcto diagnóstico es decisivo para determinar el pronóstico del tumor y definir así las opciones terapéuticas para el paciente. En las etapas iniciales el PCa, normalmente

no produce síntomas clínicos; la concentración de PSA en suero y el DRE son las pruebas de detección empleadas cuando se sospecha de la presencia tumoral. Si los resultados de estas pruebas son anómalos, el diagnóstico definitivo de PCa se realiza mediante una biopsia transrectal ecodirigida de la próstata que además permite mediante un examen histopatológico del tejido, determinar la extensión y agresividad del tumor²⁴. La introducción del análisis del PSA y de la ecografía transrectal en la práctica clínica supuso una mejora en la detección precoz de la enfermedad, pues hasta entonces mayoría de los tumores eran diagnosticados en estadio T2 mediante DRE, debido a la presencia de síntomas propios de un cáncer localmente avanzado. Ello supone, que en la actualidad el 90% de los casos de PCa se diagnostican en estadio T1, siendo asintomáticos²⁵.

2.3.1.1. Test de PSA

El PSA o antígeno prostático específico, es una proteína producida por las células epiteliales de la próstata, tanto benignas como malignas. El receptor de andrógenos (AR) regula directamente la transcripción génica del gen que lo codifica (KLK3). Una vez producido, el PSA es excretado a los ductos excretores y a continuación a la uretra para formar parte del fluido seminal. Su función es romper las proteínas semenogelina I y II que coagulan el semen, lo que incrementa la movilidad de los espermatozoides. El PSA se sintetiza como una preproteína que sufre varias proteólisis en su secuencia pasando a ser un precursor inactivo y una proteína activa posteriormente. La forma activa puede sufrir proteólisis adicionales convirtiéndose en una proteína inactiva. En el suero el PSA inactivo viaja libre (fPSA), mientras el PSA activo se une a proteínas inhibitoras de la proteólisis formando complejos (cPSA). En condiciones normales tan solo una pequeña parte del PSA entra en la circulación sanguínea, el resto queda en el interior de la próstata. Sin embargo en el cáncer se produce una pérdida de la arquitectura de las células basales y del lumen lo que permite la liberación del PSA a la circulación y el incremento de su concentración en la sangre; además disminuye la actividad proteolítica de las células epiteliales por lo que disminuye la proporción de fPSA con respecto a la de cPSA²⁶.

El Test de PSA mide la concentración de PSA total en sangre (fPSA + cPSA) en nanogramos por mililitro (ng/ml) de sangre. Es un parámetro continuo que asume que mayores niveles de PSA corresponden a un mayor riesgo de PCa. En general, hasta 4.0 ng/ml se considera el límite superior para valores normales de PSA, por encima de éste puede haber sospecha de PCa. Un valor menor de 4.0 ng/ml no garantiza la ausencia de cáncer ya que en hombres con un PSA de 2.5 a 4.0 ng/ml existe un 27% de probabilidad de detección de PCa en la biopsia ²⁷. De la misma manera, tan solo un 30% de los hombres con un PSA >4.0 ng/ml desarrollará cáncer ²⁵.

Por otra parte, los niveles de PSA se incrementan con la edad, existiendo unos rangos de normalidad por edades, por ejemplo en pacientes de entre 50 y 59 años el límite superior es 3.5 ng/ml, aunque en la práctica clínica no se utilizan ²⁵.

A pesar de uso rutinario, el test de PSA presenta una serie de limitaciones. El PSA es un marcador específico de la glándula prostática pero no del PCa ya que su concentración en la sangre puede elevarse por otras enfermedades de la próstata como la HBP o la prostatitis; así mismo, otros factores como la eyaculación, la retención urinaria, el sondaje vesical o la instrumentación uretral como las citoscopias pueden elevar los niveles de PSA, dando lugar a la realización de biopsias innecesarias ^{26,27}.

Con el objetivo de mejorar la especificidad del test de PSA en la detección del PCa se han desarrollado variantes del análisis que estudian la densidad del PSA y las proporciones de sus diferentes formas moleculares:

- Cociente PSA libre/PSA total: es utilizado para diferenciar entre el PCa y la HBP en aquellos pacientes con un PSA de 4-10 ng/ml y un DRE negativo. En condiciones normales el fPSA representa entre el 10% y el 30% del total, pero en el cáncer está proporción disminuye por lo que valores por debajo del 20% se asocian a un mayor riesgo de presencia tumoral.
- Densidad del PSA: evalúa los niveles de PSA en relación con el volumen de la próstata. Las células cancerígenas producen más PSA por unidad de volumen que las benignas, por lo que en teoría podría diferenciar entre el PCa y la HBP. Consiste en dividir el nivel total de PSA en suero entre el volumen de próstata determinado mediante ecografía transrectal.

- ProPSA: analiza los porcentajes de las diferentes isoformas de precursores del fPSA. Está indicado para aquellos pacientes con un PSA total de 2-10 ng/ml. En concreto las altas proporciones de la isoforma -2 (p2PSA) se relacionan con presencia de PCa en la biopsia.
- Índice de salud prostática: combina tres tipos de PSA: el PSA total, el fPSA y el p2PSA. Se recomienda en pacientes que muestran altos niveles de PSA total y p2PSA y un nivel bajo de fPSA y se calcula dividiendo el p2PSA entre el fPSA y multiplicándolo por PSA total ²⁸.

Otra de las limitaciones del PSA es que no identifica la agresividad con la que cursará la enfermedad lo que lleva al sobretratamiento de los pacientes ²⁹.

2.3.1.2. Examen digital rectal (DRE)

El DRE debe hacerse cuando el paciente muestre unos niveles séricos de PSA elevados y no hay una sospecha clínica de PCa. Se considera que un DRE es anormal cuando al palpar la próstata se aprecia un cambio en la textura de la glándula prostática, como por ejemplo una induración o la presencia de nódulos ²⁶. No es una prueba muy sensible ni reproducible y su valor de predicción positiva es bajo, como así lo atestigua un estudio retrospectivo realizado por Philip J. y colaboradores en el que solo el 47% de los pacientes con un DRE anormal tuvieron biopsia positiva para PCa; además un 27% de los pacientes a pesar de tener un DRE normal presentaron biopsia positiva ³⁰.

2.3.1.3. Biopsia de próstata

La biopsia transrectal guiada por ultrasonidos es la técnica más empleada para la obtención de tejido prostático. La próstata es sondeada de forma bilateral, desde la base al vértice, tanto en la zona posterior como en la lateral y a ser posible también en la periférica. Las principales complicaciones asociadas a esta técnica son la hemospermia y la hematuria y en menor medida la rectorragia (sangrado rectal), la prostatitis y la fiebre.

Las guías europeas recomiendan la adquisición de entre 10 y 12 cilindros de biopsia ²⁴. Sin embargo, el poder de detección del PCa de esta técnica es limitado con un ratio

falsos negativos del 20%. Además, biopsia transrectal guiada por ultrasonidos ofrece información poco fiable acerca el volumen, la extensión y la agresividad del PCa; hasta un 30-45% de los pacientes son reclasificados tras la prostatectomía radical ³¹.

2.4. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

2.4.1. Sistema de Puntuación de Gleason

Es un sistema de clasificación para adenocarcinomas de próstata usado para predecir la agresividad del tumor. Se basa en el grado de diferenciación glandular y en el patrón de crecimiento del tumor en el estroma prostático a partir del estudio histológico de secciones de tejido prostático fresco obtenidas de la biopsia y teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) ³². Fue descrito por el doctor Donald F Gleason en 1974 y a día de hoy sigue siendo el método de diagnóstico histológico más utilizado con algunas modificaciones.

El sistema clásico definía 5 tipos de patrones diferentes o grados (Figura 7). El patrón 1 representaba a los tumores con glándulas bien diferenciadas y buen pronóstico mientras que el patrón 5 representaba a tumores con necrosis y glándulas pobremente diferenciadas que tenían un mal pronóstico ³². La mayor parte de los tumores presentan dos patrones histológicos de crecimiento distintos, por lo que la suma del patrón o grado primario (más común) y del patrón o grado secundario da una puntuación final de Gleason que puede ir desde 2, el menos agresivo, hasta 10, el más agresivo (ej. 3 + 4 = 7). Para tumores que presentan un solo patrón, el patrón primario y el secundario se consideran el mismo (ej. 3+3 =6) ³³.

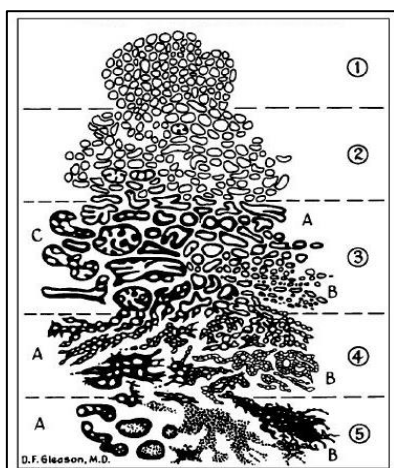


Figura 7. Representación de los grados de Gleason. (Humphrey PA. *Mod Pathol.* 2004).

El sistema clásico ha sufrido varias modificaciones pero a pesar de ello, la precisión clínica del sistema de gradación de Gleason sigue siendo limitada. Las puntuaciones de Gleason se agrupan en 3 niveles (bajo=6, medio=7, alto= 8-10); el nivel medio engloba a tumores $3 + 4 = 7$ y $4 + 3 = 7$ a pesar de que los pacientes cuyo patrón primario es 4 presentan peores respuestas que los que tienen un patrón primario 3³⁴ y el nivel alto abarca tumores con Gleason 8, 9 y 10 aunque el riesgo relativo de los tumores con Gleason 8 es menor que los tumores con Gleason 9-10³⁵.

Por ello, un grupo del *Hospital Johns Hopkins* propuso en 2013 un nuevo sistema de gradación que incluye 5 grupos de Grados basado en los patrones o grados de Gleason y que fue aceptado en 2014 en la *ISUP Consensus Conference*. El grupo de Grado 1 engloba a Gleason con puntuaciones igual o menor a 6; el grupo de Grado 2 agrupa a puntuaciones de Gleason $3 + 4 = 7$; el grupo de Grado 3 incluye a puntuaciones de Gleason $4 + 3 = 7$; el grupo de Grado IV a puntuaciones de Gleason 8 y el grupo de Grado V a puntuaciones de Gleason 9 y 10^{35 36}. Este sistema es más simple y preciso tanto para el valor pronóstico de las biopsias como para el valor pronóstico de las prostatectomías radicales. En un estudio multicéntrico las tasas de riesgo de supervivencia libre de recaída (PFS) en pacientes con prostatectomía fue de 96% para el grupo de Grado 1, 88% para el grupo de Grado 2, 63% para el grupo de Grado 3, 48% para el grupo de Grado 4 y tan solo del 26% para el grupo de Grado 5³⁵.

A pesar de ser usado como indicador pronóstico del PCa, éste puede manifestarse de forma multifocal, por lo que el Grado de Gleason puede ser característico de uno de esos focos pero no representar a todas las lesiones tumorales existentes. Además, no es indicador preciso de agresividad ya que tumores histológicamente similares pueden tener un comportamiento clínico distinto³⁷.

2.4.2. Estadificación TNM

El sistema de estadificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* fue introducido por primera vez en 1992 para clasificar el PCa e indica el tamaño tumoral y la diseminación local (letra T), la diseminación a los ganglios linfáticos regionales (letra N) y la diseminación a otras partes de cuerpo (letra T)²⁴. Ver tabla 1.

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM para el PCa establecido por la AEU.

T(Tumor primario)
Tx: No se puede evaluar el tumor primario
T0: No hay datos del tumor primario
T1: Tumor no aparente clínicamente, no palpable ni visible en pruebas de imagen
T1a: Hallazgo histológico fortuito del tumor en el 5% o menos del tejido resecado
T1b: Hallazgo histológico fortuito del tumor en más del 5% del tejido resecado
T1c: Tumor identificado en una biopsia por punción
T2: Tumor confinado dentro de la próstata
T2a: El tumor afecta a la mitad de un lóbulo prostático o menos
T2b: El tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo prostático
T2c: El tumor afecta a los dos lóbulos prostáticos
T3: El tumor se extiende a través de la cápsula prostática
T3a: Extensión extracapsular del tumor y afectación microscópica del cuello de la vejiga.
T3b: El tumor invade a una o ambas vesículas seminales
T4: El tumor invade estructuras adyacentes a las vesículas seminales como esfínter externo, recto, músculos elevadores o pared de la pelvis.
N (Ganglios linfáticos regionales)
NX: los ganglios linfáticos regiones no se pueden evaluar
N0: Ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1: Metástasis ganglionares regionales
M (Metástasis a distancia)
MX: Las metástasis a distancia no se pueden evaluar
M0: Ausencia de metástasis a distancia
M1: Presencia de metástasis a distancia
M1a: En ganglios linfáticos no regionales
M1 b: En huesos
M1c: Otros focos

Pie de tabla 1: obtenida de la Guía Clínica sobre Cáncer de Próstata de la EAU (2015)

2.4.3. Clasificación en Grupos de Riesgo D'Amico

En 1998 D'Amico y colaboradores propusieron un nuevo modelo para estratificar a los pacientes con cáncer localizado (confinado en la próstata) en distintos grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) de recurrencia bioquímica tras la cirugía de acuerdo al estadio TNM, a la puntuación de Gleason y al nivel del PSA preoperativo. Este sistema ha sido adaptado y en la actualidad los grupos de riesgo establecidos por la Asociación Europea de Urología (AEU) para pacientes con cáncer localizado y locamente avanzado presentan las siguientes características recogidas en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los grupos de riesgo establecidos por la AEU.

Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto	
cT1-T2a Gleason < 7 PSA < 10 ng/ml	cT2b Gleason 7 PSA 10-20 ng/ml	cT2c Gleason > 7 PSA > 20 ng/ml	cT3-4 o cN+*
Localizado			Locamente avanzado

Pie de Tabla 2: obtenida de la Guía Clínica sobre Cáncer de Próstata de la EAU (2015).

* Independientemente del valor de PSA o la puntuación de Gleason que tenga.

2.5. TRATAMIENTO

La elección del tratamiento dependerá del estadio clínico y del grupo de riesgo del PCa y se hará siguiendo las guías clínicas nacionales y europeas. Además se podrá tener en cuenta la esperanza de vida del paciente y los efectos secundarios específicos de cada tratamiento.

No existe un consenso para el tratamiento del PCa localizado (definido como T1-T2, Nx-N0, M0). Los pacientes con bajo riesgo pueden optar por una vigilancia activa hasta la aparición de la progresión de la enfermedad; por la braquiterapia; la radioterapia externa o la prostatectomía radical. En pacientes con riesgo intermedio y alto, la radioterapia es combinada con terapia de privación androgénica (ADT). La vigilancia activa y la braquiterapia dejan de ser una opción terapéutica en los pacientes de alto riesgo. Para pacientes en una etapa avanzada de la enfermedad la ADT es la terapia estándar²⁴.

El PCa es una enfermedad dependiente de andrógenos ³⁸. Por ello la manipulación de los niveles hormonales constituye la diana para el tratamiento dirigido de la enfermedad.

En este sentido, la terapia hormonal o ADT disminuye la producción de andrógenos y bloquea su unión con el AR con el objetivo de ralentizar el crecimiento de las células prostáticas tumorales. Puede llevarse a cabo mediante una castración quirúrgica u orquectomía bilateral que consiste en la extirpación de los testículos o mediante una castración médica lograda con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH), antagonistas de la LHRH, con estrógenos y con antiandrogénicos ²⁴. La ADT puede eliminar entre el 90% y el 95% de la testosterona sérica, reduciendo los 500-600 ng/ml (17.3–20.8 nmol/l) normales por debajo de 50 ng/ml (1.73 nmol/l), considerado el límite superior para niveles de castración. A su vez deriva en una reducción de los niveles de PSA en el suero de los pacientes que permite monitorizar la respuesta de éstos a la terapia ³⁸.

Inicialmente en la mayoría de los pacientes tratados con ADT se produce una regresión tumoral, con un periodo de quiescencia de entre 12 y 18 meses, tras los cuales entre el 10% y el 20% de los pacientes sufre una progresión de la enfermedad hacia una forma conocida como PCa resistente a la castración (CRPC) que puede ser diagnosticada mediante un incremento de los niveles de PSA (recurrencia bioquímica), la aparición de síntomas (progresión clínica) y/o la aparición de metástasis (progresión radiográfica) ³⁹. En el estadio de CRPC la enfermedad es incurable, y para aquellos pacientes con CRPC que han desarrollado metástasis (mCRPC) la supervivencia media es de 16-18 meses ⁴⁰. Tratamientos como abiraterona (inhibidor irreversible de la enzima CYP17A1 que bloquea la síntesis de andrógenos en testículos, glándulas adrenales y células tumorales), la enzalutamida (inhibidor competitivo de AR que inhibe la unión de los andrógenos al AR, la translocación del complejo andrógeno-AR al núcleo y su unión al ADN) y el docetaxel han mostrado beneficios de supervivencia en estos pacientes ³⁹.

3. HORMONAS SEXUALES Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE PRÓSTATA

3.1 ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroideas sintetizadas a partir del colesterol, producidas principalmente en los testículos en forma de testosterona pero también en las glándulas suprarrenales en forma de androstenediona y dehidroepiandrosterona (DHEA), ambos precursores de la testosterona. La esteroidogénesis o síntesis de hormonas esteroideas para producción de andrógenos está regulada por el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal de retroalimentación negativa ⁴¹ (ver Figura 8).

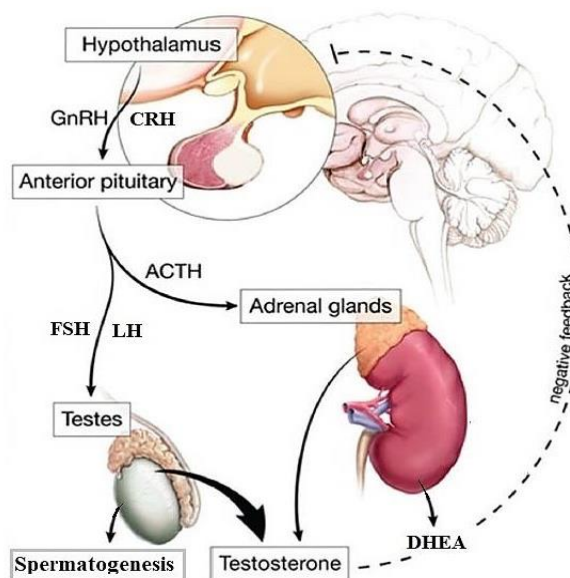


Figura 8. Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal para la síntesis de andrógenos. **GnRH/LHRH** (hormona liberadora de gonadotropina u hormona luteinizante); **CRH** (hormona liberadora de corticotropina); **LH** (hormona luteinizante); **FSH** (hormona folículoestimulante); **ACTH** (hormona adrenocorticotropa; **DHEA** (dehidroepiandrosterona). Adaptación de *Aragon-Ching JB et al. Front Biosci 2007*.

En las células de Leydig la síntesis de testosterona comienza con la unión de la hormona luteinizante (LH) a receptores acoplados a proteínas G (LHCGR) que estimula la síntesis de AMPc. El AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) que a su vez activa a la proteína Star que moviliza el colesterol hacia el interior de la mitocondria. En la membrana interna mitocondrial, el colesterol es convertido a pregnenolona por la acción

de la enzima citocromo P450_{sc} (CYP11A1). La síntesis puede continuar por dos vías diferentes en las que participan distintas enzimas dando lugar a una serie de intermediarios también dispares pero que convergen en la síntesis de testosterona⁴² (ver Figura 9).

La testosterona es el andrógeno más abundante en el suero sanguíneo, sin embargo el andrógeno más abundante en la próstata y principal responsable del crecimiento y la patología de la glándula es la dihidrotestosterona (DHT). Ello se debe a que la testosterona es convertida a DHT por la enzima SRD5A o 5 α -reductasa (5- α R)⁴². Además de ser un precursor de la DHT, la testosterona puede convertirse en el estrógeno estradiol en una reacción catalizada por la enzima aromatasa (codificada por el gen CYP19A1)⁴².

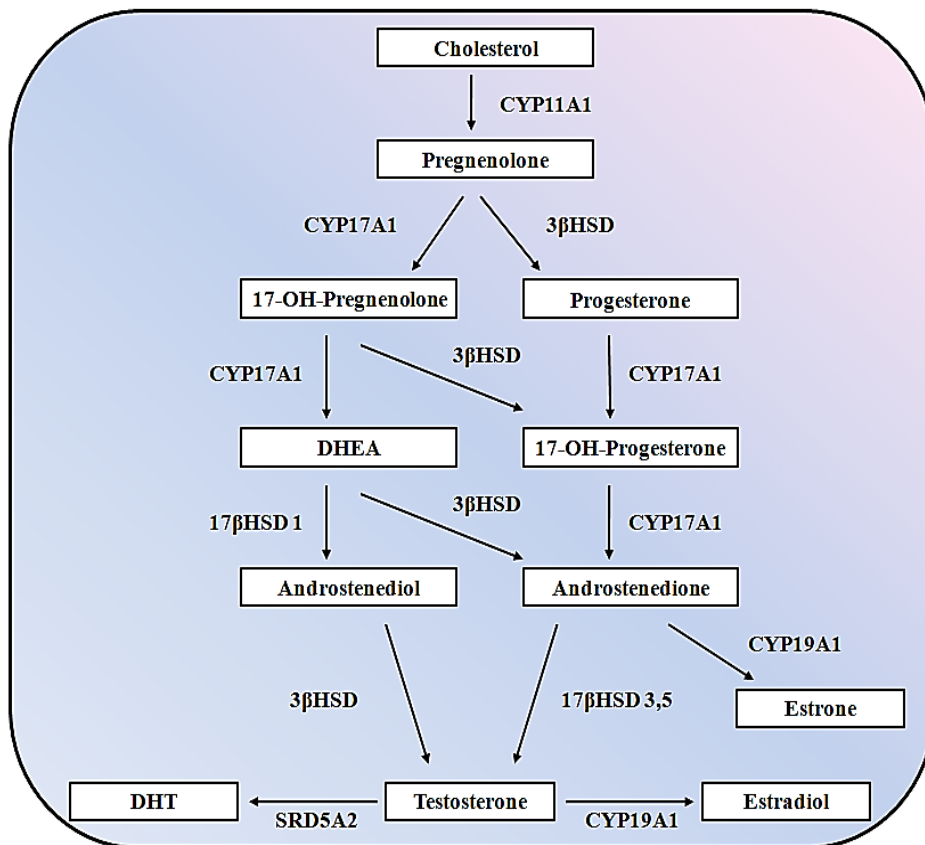


Figura 9. Representación esquemática de las vías de síntesis de andrógenos. Enzimas: **CYP11A1** (citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipéptido 1); **CYP17A1** (citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1); **3βHSD** (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ -5-4 isomerasa); **17βHSD 3,5** (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, subtipos 3 y 5); **CYP19A1**

(citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1); **SRD5A2** (esteroide 5- α -reductasa tipo 2). Adaptación de *Luu-The V. et al. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008*.

Los andrógenos ejercen su acción biológica mediante su unión al receptor de andrógenos (AR). La unión de la testosterona y/o DHT al dominio de unión a ligando (LBD) de AR, conlleva a una rápida translocación al núcleo del complejo AR-ligando. En el núcleo, AR dimeriza y se une a la cromatina en una región reguladora de los genes diana conocida como elementos de respuesta a andrógenos (AREs) y recluta a cofactores que participan en la transcripción génica para la proliferación y supervivencia de las células tumorales ⁴³.

Por lo tanto, la síntesis de los andrógenos y la señalización de AR juegan un papel fundamental en la carcinogénesis y en la progresión de la enfermedad. Por ello y debido a que los tumores de próstata no tienen una buena respuesta a la quimioterapia, la ADT es la terapia de primera línea en estadios avanzados de la enfermedad ⁴³.

3.2 ESTRÓGENOS

Numerosos estudios evidencian que además de los andrógenos, los estrógenos participan en el desarrollo de la próstata y parecen desempeñar un papel en el PCa ⁴⁴.

Éstos están presentes en bajas concentraciones a lo largo de la vida del hombre debido a la síntesis de estradiol a partir de testosterona en una conversión catalizada por la enzima aromatasa ⁴². Sin embargo, los bajos niveles de estrógenos (en relación a los de andrógenos) son incrementados en dos etapas de la vida, el desarrollo embrionario y el envejecimiento ⁴⁵.

En tumores metastásicos, la aromatasa (CYP19A1) se expresa 30 veces más en comparación a los tumores primarios y su eliminación en ratones (conocidos como *knock out*) conlleva una reducción en el riesgo de PCa al ser expuestos a testosterona y estrógenos, lo que demuestra la importancia de los estrógenos en la carcinogénesis ⁴⁶.

Los estrógenos ejercen su acción biológica en la próstata mediante su unión al receptor de estrógenos (ER). Existen dos subtipos, el ER α y el ER β , codificados por dos genes diferentes que se localizan en distintos cromosomas. Aunque ambos receptores llevan a

cabo un mecanismo de acción similar, desencadenan respuestas transcripcionales distintas ya que reclutan diferentes co-factores y existen sitios de unión que son específicos para uno de los subtipos de ER ⁴⁴.

ER α y ER β parecen jugar un papel contrario en la próstata, ER α promueve inflamación, proliferación celular y una diferenciación anormal (ver Figura 10), a diferencia de ER β que parece tener una acción antiproliferativa, antiinflamatoria y pro-diferenciadora ⁴⁴. Los estudios con ratones *knock out* para ER α y Er β han demostrado que la estrogenización neonatal de la próstata causa hiperplasia, neoplasia prostática intraepitelial (PIN) e infiltración de células inflamatorias, todo ello mediado por ER α ⁴⁵.

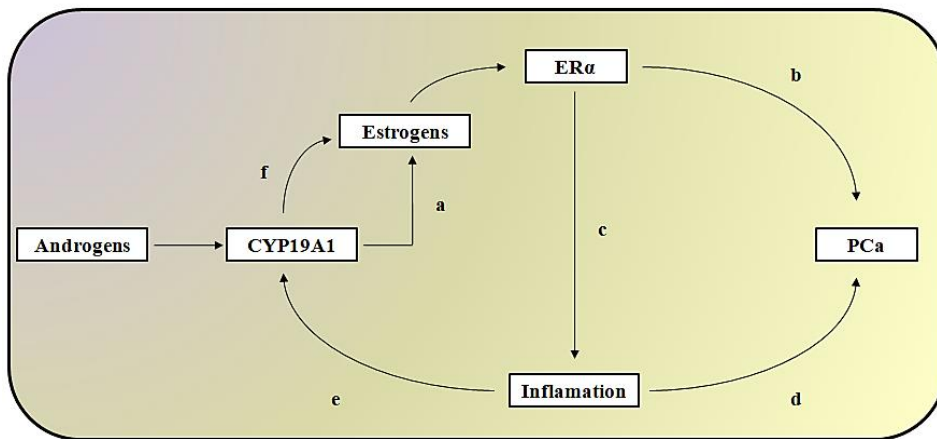


Figura 10. Posible ciclo de retroalimentación positiva entre la aromatasa, los estrógenos y la inflamación que conduce al PCa. a) La aromatasa produce estrógenos en la próstata normal. b) La señalización de ER α , resulta de forma potencial en PCa y c) en inflamación. d) la inflamación a su vez resulta en PCa y e) conduce a la expresión de la aromatasa. f) Ésta estimula más aún la producción de estrógenos, la activación de ER α , la inflamación y PCa. Adaptación de *Ellem SJ et al. Nat Rev Cancer. 2007.*

En la próstata normal y en estadios tempranos del PCa, ER β es el subtipo más expresado, por lo que los estrógenos pueden ser beneficiosos. Sin embargo, durante la progresión hacia PCa la expresión de los subtipos de ER cambia y ER α es sobreexpresado mientras que la expresión de ER β disminuye ⁴⁷. Sin embargo, a pesar de que la pérdida de expresión de ER β parece contribuir a la progresión del PCa en la

enfermedad confinada al órgano, la fuerte re-expresión de ER β en sitios metastásicos implica un papel potencial de éste en la progresión independiente de andrógenos ⁴⁵.

4. NUEVOS BIOMARCADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Como hemos visto anteriormente los marcadores empleados en la actualidad no son lo suficientemente específicos ni precisos para diagnosticar y pronosticar la agresividad tumoral. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos biomarcadores para el PCa continúa.

En este sentido, han surgido numerosos biomarcadores que pueden ayudar a los clínicos en la toma de decisiones como el PCA3 (prostate cancer associated 3), un marcador específico del PCa o la detección de la fusión génica Tmprss2- ERG ⁴⁸.

Además en los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto la potencial utilidad de las células tumorales circulantes, los exosomas, los polimorfismos de nucleótido simple y los miRNAs entre otros, para el manejo del PCa.

4.1. SNPs

4.1.1. Generalidades

El proyecto Genoma Humano (The Human Genome Project)⁴⁹ presentado en 2003 permitió conocer la secuencia completa del genoma, así como las variaciones genéticas entre los seres humanos. El genoma humano de dos personas seleccionadas al azar es idéntico en un 99.9%, el 0.1% restante contiene variaciones en la secuencia conocidas como polimorfismos, originadas a partir de mutaciones en el ADN ⁵⁰. Según *Cavalli-Sforza & Bodmer*, el término polimorfismo se define como la ocurrencia en una misma población de dos o más alelos en un mismo locus, cada uno de ellos con una frecuencia apreciable y para ser considerados como tal deben ocurrir al menos en el 1% de la población ⁵¹.

El cambio puntual de un nucleótido por otro se denomina polimorfismo de nucleótido único (SNP) y es la forma más simple y común de variación genética que existe. Cualquiera de las bases del ADN puede ser sustituida por otra (una A en lugar de una T,

una T en lugar de una C, una G en lugar de una A, etc). Teóricamente, un SNP podría tener cuatro formas posibles, o alelos; sin embargo, la mayor parte de los SNPs tienen solo dos formas⁵¹ (Figura 11).

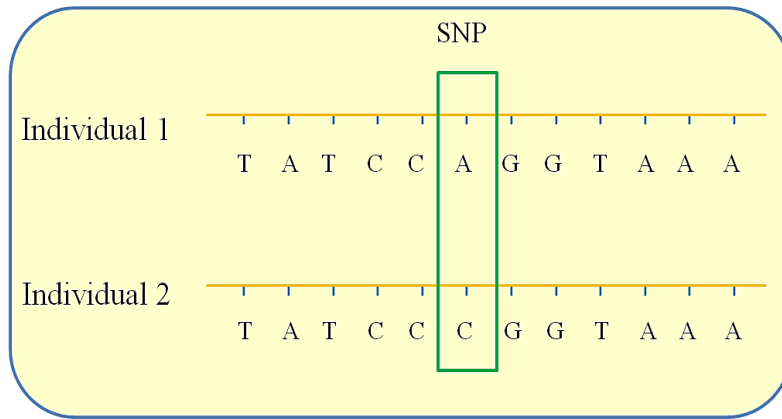


Figura 11. Representación de un SNP. Adaptación de *Shastry BS. J Hum Genet. 2007.*

La tasa de variación es de un SNP cada 100 a 300 bases a lo largo de todo el genoma⁵². Se estima que el 50% de ellos tienen lugar en regiones no codificantes y el 50 % restante ocurre en regiones codificantes o intrónicas, la mitad son SNPs sinónimos (sSNP) y la otra mitad son SNPs no sinónimos (nSNP). Los sSNPs son mutaciones silenciosas que no modifican el aminoácido codificado y no suelen ser elegidas por la selección natural. En cambio los nSNPs son mutaciones con cambio de sentido (“missense”, “nonsense” o “frameshift”) que modifican el aminoácido codificado y suelen estar sujetas a la selección natural⁵⁰. Pero tanto los sSNP como los nSNP pueden alterar la conformación del mRNA afectando a la expresión y actividad de las proteínas y en consecuencia contribuirían a la sensibilidad a padecer una enfermedad, a sentir dolor o a la respuesta a un fármaco⁵³. Así mismo, los SNPs intrónicos pueden afectar a la eficiencia del “splicing” del mRNA⁵⁴.

4.1.2. SNPs en el Cáncer de Próstata

Estudios epidemiológicos muestran una mayor incidencia de PCa en hombres afroamericanos comparado con hombres americanos de origen asiático, lo que sugiere la

importancia de los factores genéticos en las distintas frecuencias observadas en varias poblaciones ²².

Por otra parte, estudios en gemelos han mostrado que existe al menos un 50% más de riesgo de PCa en gemelos monocigóticos que en gemelos dicigóticos, lo que sugiere que los factores genéticos, más que el estilo de vida compartido, son los responsables de la agregación familiar en el PCa ²². En estos casos han sido implicadas variantes genéticas raras y altamente penetrantes. Sin embargo, estas variantes genéticas solo parecen ser responsables de una minoría de los casos de PCa, por lo que más bien podrían estar implicadas variaciones comunes y con baja penetrancia en diferentes genes en el PCa ⁵⁵. Aunque cada alelo de susceptibilidad confiere solo un pequeño incremento en el riesgo de forma individual, sus riesgos actúan multiplicativamente en conjunto ²².

El reciente desarrollo de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) ha permitido la identificación de variantes genéticas comunes asociadas con el PCa ⁵⁵. Así mismo, diversos estudios han analizado SNPs en relación a la agresividad en casos de PCa basados en las características clínicas en el momento del diagnóstico o en la progresión tumoral, y en el estudio de las respuesta a los tratamientos ⁵⁶.

Por ejemplo, la región 8q24 contiene hasta 5 loci diferentes asociados con riesgo de PCa ⁵⁷. Además se han identificado variantes en genes específicos de la próstata o en genes relacionados con el metabolismo y la inflamación. Por ejemplo, la variante rs1512268 se encuentra en la región génica próxima al gen NKX3.1 el cual se expresa únicamente en la próstata y participa en el crecimiento y diferenciación del epitelio prostático ⁵⁷.

Los SNPs asociados a riesgo podrían mejorar la sensibilidad de los programas de cribado de PCa mediante PSA evitando biopsias no necesarias. En relación a ello, varios estudios han encontrado que la variante rs2735839 del gen KLK3 (19q13) que codifica el PSA, es un loci de riesgo para el PCa y puede influir en los niveles de PSA ⁵⁸. *Aly* y colaboradores ⁵⁹ evaluaron 35 SNPs relacionados con riesgo de PCa en 5241 hombres suecos que se sometieron a un biopsia de próstata y comprobaron que la adición de los SNPs al modelo clínico existente, podía reducir el número de biopsias necesarias para detectar el mismo número de tumores, pudiendo evitarse el 22.7% de las biopsias.

Adicionalmente, otro panel formado por 35 SNPs asociados a riesgo de PCa se evaluó en pacientes del ensayo clínico REDUCE. Estos pacientes tenían una biopsia inicial negativa y fueron sometidos a posteriores biopsias a los dos y cuatro años. El riesgo de PCa fue estimado según el modelo clínico combinándolo con el panel de SNPs. Al incluir el panel de SNPs mejoró la clasificación de riesgo en el 33% de los pacientes y hubo una mejor correlación con el resultado de las biopsias ²¹.

En relación a la agresividad tumoral, diferentes grupos han investigado la capacidad de los SNPs relacionados con riesgo de PCa para distinguir el grado de agresividad de la enfermedad. Bensen y colaboradores por ejemplo, usando un panel de 1.536 SNPs, genotiparon a una cohorte de más de 2.000 pacientes americanos de origen europeo y africano y observaron que 4 SNPs (rs2660753, rs13254738, rs10090154 y rs2735839 (gen KLK3)) se asociaban a PCa agresivo ⁵⁸.

En lo referente a la respuesta al tratamiento, algunos estudios han analizado la relación de los SNPs de riesgo de PCa con las diferentes respuestas. Así, *Huang* y colaboradores evaluaron 20 SNPs asociados previamente a riesgo de PCa, en 320 pacientes con PCa localizado que habían sido sometidos a una prostatectomía radical. Observaron que 3 SNPs (rs1447295 (8q24), rs7920517 y rs10993994 (10q11)) estaban relacionados con recurrencia bioquímica ⁶⁰. En otro estudio realizado por este grupo, evaluaron 19 SNPs relacionados con riesgo como predictores de pronóstico de supervivencia tras la administración de ADT. Dos de los SNP estudiados, rs16901979 y rs7931342 se asociaron a mortalidad específica por PCa ⁶¹.

4.1.2.1 SNPs en genes de la síntesis y metabolismo de los esteroides sexuales

Debido a su papel regulador, variaciones en genes involucrados en la síntesis y metabolismo de los andrógenos han sido ampliamente estudiados en relación al PCa ⁶². Teniendo en cuenta la conversión de andrógenos en estrógenos y el efecto que ejercen éstos en el tejido prostático por la interacción con sus receptores, variaciones en genes que participan en su señalización han sido igualmente estudiados ⁶³. Polimorfismos en estos genes podrían alterar los niveles de andrógenos, estrógenos y su señalización en la próstata y estar relacionados con el riesgo, la progresión o la agresividad en el PCa ⁵⁶.

Numerosos estudios han mostrado el impacto de SNPs en genes implicados en la síntesis y metabolismo de andrógenos en el PCa⁶² (Tabla 3).

Tabla 3. SNPs asociados con el PCa a lo largo de la síntesis (a) y metabolismo (b) de la testosterona. (*Schleutker J Mol Cell Endocrinol. 2012*).

a)

Testosterone biosynthesis genes	Variant	Familial cases	Unselected cases	Original reference/no. of cases and population
<i>LHB</i>				
<i>LHB-V</i> genotype that carries two linked substitution mutations	rs1800447 (W8R, Trp8Arg, TGG>AGG) rs34349826 (W28R, I15T or I35T, Ile15Thr)	OR = 1.29, 95% CI 0.96–1.75		Elkins et al. (2003)/834, US
<i>CYP11A1</i>	(tttta) _n repeat (tttta) ₄ absence		OR = 1.79, 95% CI 1.08–2.97, p = 0.025 Metastatic disease (stage D): OR = 1.76, 95% CI 1.07–2.90, p = 0.026	Kumazawa et al. (2004)/278, Japanese
<i>HSD3B1</i>	rs1047303 (N367T, Asn367Thr, AAC>ACC)	RR01.52, 95% CI 0.95–2.45	RR = 1.50, 95% CI 1.01–2.24	Chang et al. (2002a)/245, US Caucasians
<i>HSD3B2</i>	rs1856888 rs1819698 (7519c>g)	RR = 1.52, 95% CI 0.95–2.45	Efficacy on androgen deprivation therapy, p = 0.0047 RR = 1.50, 95% CI 1.01–2.24	Ross et al. (2008)/529, US Chang et al. (2002a)/245, US Caucasians
<i>CYP17A1</i>	rs1538989 rs43572 (34T>C; A1/A2)		p = 0.003 For African descent patients increased susceptibility with A2 OR = 1.56, 95% CI 1.07–2.28	Beuten et al. (2009)/886, non-Hispanic Caucasians Ntais et al. (2003a)/meta-analysis of 10 studies and 2404 cases
	rs619824	p = 0.004		Douglas et al. (2005)/376, US
	rs6163, rs6162, and rs743572		p = 0.0014–0.0028	Sarma et al. (2008)/131, African-American
	rs10883782, rs1004467, and rs17115144		High-risk genotypes in African-American p = 0.020–0.043	Beuten et al. (2009)/886, multiethnic
<i>HSD17B1</i>	rs605059 (S313G, Ser313Gly, AGC>GGC, c.937A/G)		Suggestive association p = 0.02	Cunningham et al. (2007)/937, US
<i>HSD17B3</i>	rs2066479 (G289S, Gly289Ser, GGT>AGT)		OR = 2.5, 95% CI 1.03–6.07	Margiotti et al. (2002)/103, Italian

INTRODUCCIÓN

b)

Testosterone metabolism genes	Variant	Familial cases	Unselected cases	Reference/no. of cases and population
SRD5A2	rs9282858 (A49T, Ala49Thr, GCC>ACC)		African-American carriers having a 7.2-fold risk for clinically advanced disease, 95% CI 2.17–27.91; $p = 0.001$ Carriers of the rarer T49 variant were at 60% higher risk of PCa OR = 1.60, 95% CI 1.09–2.36, $p = 0.02$	Makridakis et al. (1999)/388, Hispanic and African-American Hayes et al. (2007)/827, Australian
	rs10529926 (TA dinucleotide)		Decreased association between PCa and long repeats OR = 0.86, 95% CI 0.74–1.00, $p(\text{heterogeneity}) = 0.79$	Li et al. (2011)/meta-analysis of 31 studies and 14,726 cases
SRD5A1	rs1691053		Men with AG or GG versus AA had an OR of 1.8, 95% CI 1.04–3.13	Setlur et al. (2010)/221, Austrian
AR	rs4045402 (CAG repeat)		1.19-fold risk was observed in men with shorter CAG (≤ 21) repeats 95% CI 1.07–1.31	Zeegers et al. (2004)/meta-analysis of 19 studies and 4274 cases
	GGN repeat		1.31-fold risk was observed in men with shorter GGN repeats 95% CI 1.06–1.61	Zeegers et al. (2004)/meta-analysis of 19 studies and 4274 cases
	rs6152 (E211E, Glu211Glu, GAG>GAA, alias E213E)		E211 A allele may be a marker for decreased risk of metastatic PCa 15% stage I–II and 19% in stage III tumors, $p = 0.03$	Hayes et al. (2005)/815, Australian
<i>CYP3A gene family</i>				
CYP3A4	rs2740574 (G>A mutation (CYP3A4-V, g. –392A>G, CYP3A4*1B))		Association with higher clinical stage and grade Adjusted odds ratio = 9.45; 95% CI 2.54–35.17; $\chi^2(1) = 12.28$; two-sided $p < 0.001$	Rebeck et al. (1998)/230, US
CYP3A5	rs776746 (6986A>G)		More aggressive disease in Caucasians OR = 1.91, 95% CI 1.02–3.57, $p = 0.04$	Plummer et al. (2003)/440, US
CYP3A43	rs680055 (CYP3A43*3, P340A, Pro340Ala, CCC>GCC)	OR = 5.86, 95% CI 1.10–31.16	African-Americans	Zeigler-Johnson et al. (2004)/622, US

4.1.3. Genes y SNPs estudiados

Considerando su participación en los procesos de síntesis y metabolismo de los esteroides sexuales, los genes LHCGR, CYP17A1, AR, ESR1 y ESR2 son los elegidos para el estudio. En la tabla 4 se detallan los polimorfismos de estudio y en la Figura 12 las distintas frecuencias alélicas de éstos en las distintas poblaciones. Brevemente, los individuos de origen americano, europeo y surasiático, son similares en términos de frecuencias alélicas para el rs6152 del gen AR y para el rs2293275 del gen LHCGR. Mientras, los individuos africanos y los asiáticos del este muestran frecuencias superiores e inferiores, respectivamente, para el alelo que en conjunto es más común. En el caso del rs1256049 del gen ESR2 y del rs1062577 del gen ESR1, la frecuencia del alelo más común es muy superior en asiáticos del este en comparación con las poblaciones restantes. Para las variantes rs743572, rs6162 y rs6163 del gen CYP17A1 existe una inversión del alelo más frecuente en los individuos de este asiático. Con respecto al rs1004467 del gen CYP17A1, los individuos europeos presentan una menor frecuencia del menos habitual respecto al resto. Por último, el rs9332969 del gen AR ha sido únicamente estudiado en individuos de ascendencia mexicana y en individuos japoneses.

Tabla 4. SNPs incluidos en el estudio.

Gen	Cr	SNP (rs)	Localización ¹	MAF ²	Cambio nt	Cambio aa	Tipo de variante
AR	X	rs6152	67545785	0.24 (A)	G>A	-	Sinónima
AR	X	rs9332969	67722899	- ³	G>A	Arg841His	Cambio de sentido
CYP17A1	10	rs743572	102837395	0.41 (G)	A>G	-	5'UTR
CYP17A1	10	rs6162	102837224	0.44 (A)	G>A	-	Sinónima
CYP17A1	10	rs6163	102837167	0.41 (A)	C>A	-	Sinónima
CYP17A1	10	rs1004467	102834750	0.22 (G)	A>G	-	Intrónica
LHCGR	2	rs2293275	48694236	0.41 (T)	T>C	Asn312Ser	Cambio de sentido
ESR1	6	rs1062577	152102770	0.14 (A)	T>A	-	3'UTR
ESR2	14	rs1256049	64257333	0.13 (T)	C>T	-	Sinónima

INTRODUCCIÓN

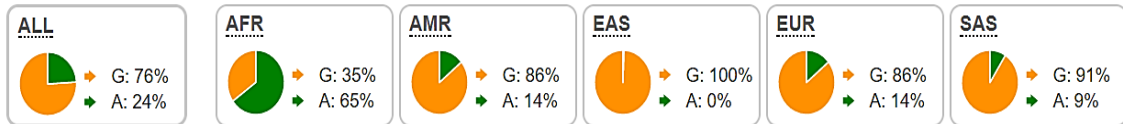
Pie de Tabla 4: cr (cromosoma); nt (nucleótido); aa (amino ácido); MAF (alelo menos frecuente).

¹ GRCh38.

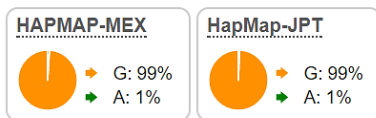
² Alelo menos frecuente en la media de las poblaciones (1000 Genomes Phase III).

³ Solo ha sido estudiado en población de ascendencia mexicana y japonesa.

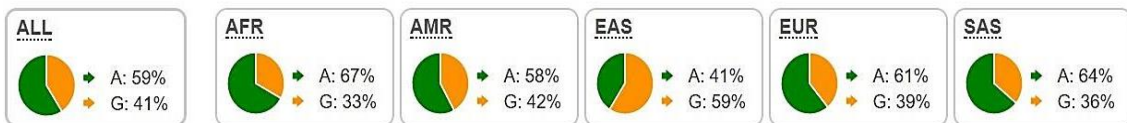
rs6152



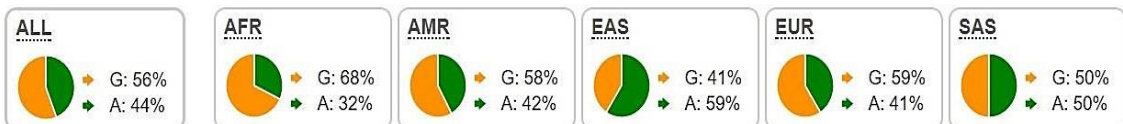
rs9332969*



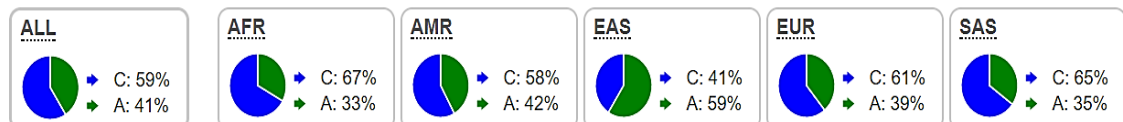
rs743572



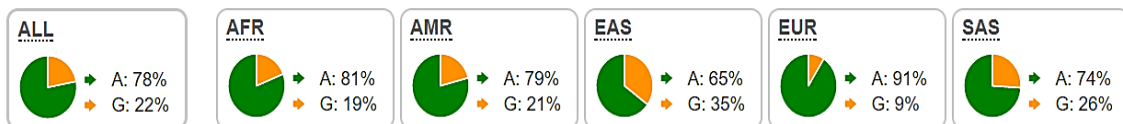
rs6162



rs6163



rs1004467



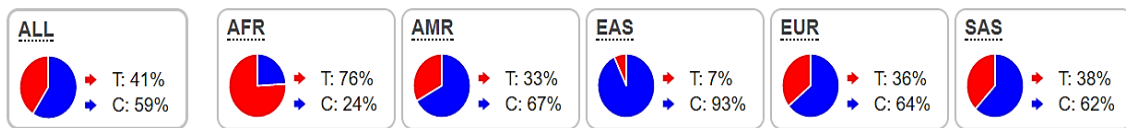
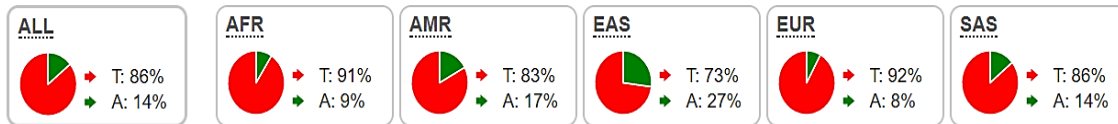
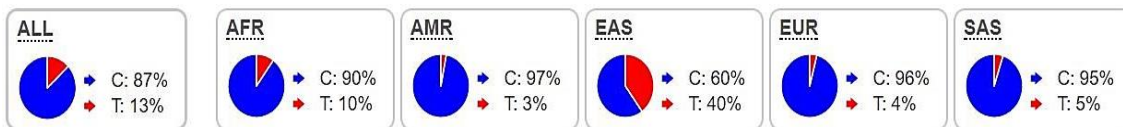
rs2293275rs1062577rs1256049

Figura 12. Frecuencias de los SNPs estudiados en las distintas poblaciones. Abreviaturas: AFR (africanos); AMR (americanos); EAS (asiáticos del este); EUR (europeos); SAS (surasiáticos). *HapMap-MEX: individuos de ascendencia mexicana en los Angeles. HapMap-JPT: individuos japoneses en Tokio.

LHCGR

El gen LHCGR se localiza en el cromosoma 2, en la región p21, está formado por 11 exones complementados por el exón 6a (exclusivo de primates) (Figura 13) y codifica el receptor de la hormona luteinizante y de la coriogonadotropina. LHCGR pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). La proteína consta de 699 aminoácidos con un peso molecular de 85-95 Kilodaltons (kDa). Está formada por un dominio N-terminal (NTD) rico en cisteína, una región bisagra que conecta con el dominio de repetición rico en leucina (LRRD), un dominio serpentina y un dominio C-terminal (CTD) transmembrana ⁶⁴.

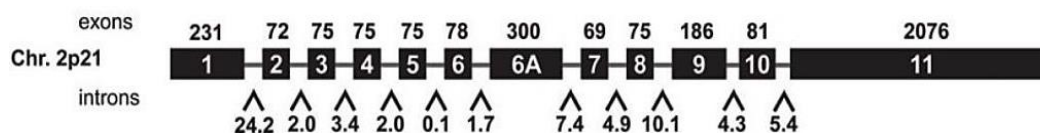


Figura 13. Representación esquemática del gen LHCGR. (Troppmann B et al. *Hum Reprod Update*. 2013)

LHCGR media la acción de dos hormonas relacionadas, la hormona luteinizante producida por la glándula pituitaria o hipófisis y la gonadotropina coriónica secretada por la placenta. LHCGR se expresa principalmente en la teca, la granulosa y las células lúteas en el ovario en las mujeres; y en las células de Leydig de los testículos en los hombres, donde su unión a LH estimula la síntesis de testosterona⁶⁴. En los hombres, además de expresarse en la superficie de las células de Leydig, LHCGR es capaz de expresarse en la superficie de las células prostáticas cancerígenas⁶⁵.

Mutaciones y SNPs en LHCGR están relacionados con desórdenes en el desarrollo sexual y desórdenes reproductivos, como por ejemplo la hipoplasia de las células de Leydig. Sin embargo, a pesar de su participación en el inicio de la síntesis de andrógenos, apenas hay estudios genéticos sobre la posible implicación de variaciones en su secuencia en el PCa.

Uno de los escasos polimorfismos estudiados es el rs2293275 que ha sido asociado con una disminución del riesgo de PCa y al mismo tiempo con un incremento en riesgo de muerte por PCa⁶⁶.

CYP17A1

El gen CYP17A1 se localiza en el cromosoma 10, concretamente en la región q24.3. Está formado por ocho exones y codifica una proteína de 508 aminoácidos y 5,7 kDa (Figura 14). CYP1A1 pertenece a la superfamilia del citocromo P450, enzimas monooxigenasas que contienen un grupo hemo y catalizan reacciones oxidativas⁶⁷.

CYP17A1 parece expresarse en la mayor parte de los tejidos, pero se detecta principalmente en testículos y glándulas adrenales⁶⁸.

El citocromo P450 17A1 tiene actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa mediante cuales cataliza la conversión de pregnenolona a 17-OH pregnenolona y de ésta a DEA, respectivamente. De forma similar, cataliza la conversión de progesterona a 17-OH progesterona y de ésta a androstenediona, ambos precursores de la testosterona ⁴². En humanos la 17-OH progesterona es peor sustrato para la actividad liasa del CYP17A1 y la síntesis de androstenediona es baja, por ello la síntesis de androstenediona proviene principalmente de la conversión de DHEA catalizada por la 3 β -HSD más que por la actividad del CYP17A1 ⁶⁷. Dentro de las glándulas suprarrenales, CYP17A1 no se expresa en la zona glomerular (la parte más externa) por lo que se sintetizan mineralocorticoides a partir de la pregnenolona y progesterona. En la zona intermedia, la zona fascicular, CYP17A1 si se expresa pero sólo tiene actividad 17 α -hidroxilasa por lo que se sintetizan glucocorticoides a partir de 17-OH pregnenolona y de 17-OH progesterona. Sólo en la parte interna de las glándulas suprarrenales, la zona reticular, y en las células de Leydig de los testículos se produce ambas actividades, 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa, para generar DHEA ⁶⁷.

Tanto la actividad hidroxilasa como la liasa son reguladas por la NADPH-citocromo P450 reductasa, pero además la actividad liasa es también regulada por la NADPH-citocromo b5 reductasa y ésta se expresa únicamente en la zona reticular.

Alteraciones en la actividad de CYP17A1 se han asociado distintas enfermedades relacionadas con las hormonas como la hiperplasia suprarrenal congénita, el síndrome de ovario poliquístico y el PCa ⁶⁹.

Se ha sugerido que además de participar en la síntesis de esteroides, CYP17A1 podría catalizar reacciones usando como sustratos distintos xenobióticos con propiedades pro-cancerígenas como DMBA (7,12-dimetil-1,2-benzatraceno) y aflatoxina B1. Esta actividad es de gran interés, ya que la bioactivación de este tipo de compuestos podría estimular la carcinogénesis tejidos como los ovarios, los testículos y las glándulas adrenales donde se encuentra CYP17A1 ⁶⁹.

La importancia de CYP17A1 se debe a que al catalizar varios pasos clave en la síntesis de esteroides sexuales, la inhibición de su actividad es útil en el tratamiento del PCa. Inhibidores de CYP17A1 como el ketoconazol o más recientemente la abiraterona acetato, han sido desarrollados para tratar el PCa en estadio avanzado de CPRC ³⁹. La

abiraterona acetato inhibe ambas actividades de CYP17A1, la 17 α -hidroxilasa y la 17,20-liasa, lo que provoca una reducción de andrógenos así como de glucocorticoides que lleva a un exceso de mineralocorticoides (cortisol). Para evitar los efectos secundarios producidos por el nivel elevado de cortisol, la abiraterona acetato se administra junto con un corticosteroide llamado prednisona ³⁹.

Se han descrito más de 100 polimorfismos distintos en CYP17A1, la mayor parte de ellos en zonas intrónicas del gen y tan solo una minoría han sido estudiados a nivel poblacional (Figura 14) ⁶⁸.

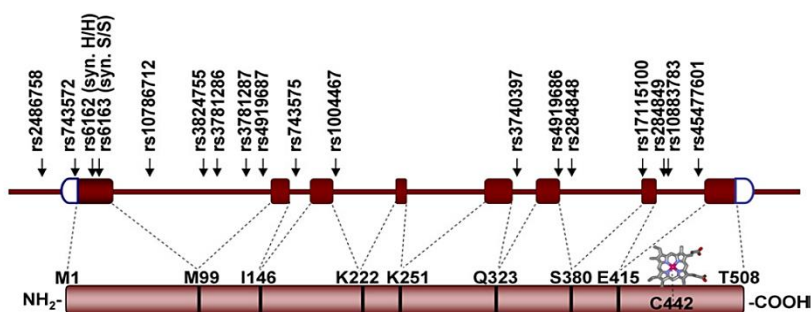


Figura 14. Representación esquemática del gen y la proteína CYP17A1. Se muestran aquellos SNPs más frecuentes en la población. (Gilep AA et al. *Biochim Biophys Acta*. 2011).

Distintos SNPs en el gen CYP17A1 han sido evaluados en relación al riesgo de desarrollo de PCa. El SNP más ampliamente estudiado es el rs743572 (-34T>C) que se ubica en la región 5' no traducida del gen. Este SNP podría crear un sitio de unión al factor de transcripción Sp-1 adicional en la región promotora del gen, incrementando la transcripción del gen ⁷⁰. Una investigación llevada a cabo por *Sarma* y colaboradores ha mostrado una asociación de las variantes rs743572, rs6162 y rs6163 con el riesgo de PCa en hombres afroamericanos ⁷¹. Sin embargo, en caucásicos no se ha hallado una relación entre el rs743572 y el riesgo de PCa ⁷². Recientemente un meta-análisis que incluyó un total de 38 estudios con hombres de diferente origen racial sugiere que el rs743572 podría conferir riesgo de PCa solamente en hombres con ascendencia africana ⁷³. Otro polimorfismo del gen CYP17A1, el rs1004467, se ha relacionado con un incremento de los niveles de testosterona y DHT ⁷⁴.

También ha sido evaluado su valor predictivo debido al papel de los inhibidores de CYP17A1 en el tratamiento de PCa, sugiriendo que las variantes podrían influir en la progresión de los pacientes hacia CRPC. Los SNPs rs743572, rs6162, rs6163, y rs1004467 han sido asociado con riesgo de progresión hacia CRPC en pacientes japoneses tras la administración de ADT ⁷⁵.

AR

El gen AR se localiza en el cromosoma X, en la región q11-q12. La secuencia del gen comprende 2757 nucleótidos y 8 exones, codificando una proteína de 110 kDa formada por 919 aminoácidos ⁷⁶ y que se expresa en diferentes tejidos como próstata, testículos, tejido adiposo, hígado, músculo cardíaco, cerebro y hueso, entre otros ⁷⁷. AR está formada por tres dominios funcionales principales: el dominio NTD formado por los residuos 1-555 y que comprende la función de activación transcripcional (AF)-1; el dominio de unión a ADN (DBD) formado por los residuos 555-623 y el dominio C-terminal de unión al ligando (LBD) que abarca los residuos 665-919 y que se encuentra unido al DBD por una región flexible (residuos 623-665) ⁷⁶. Además posee una señal de localización nuclear (NLS) (residuos 617-633) localizada entre DBD y la región bisagra, responsable de la importación nuclear del receptor (Figura 15).

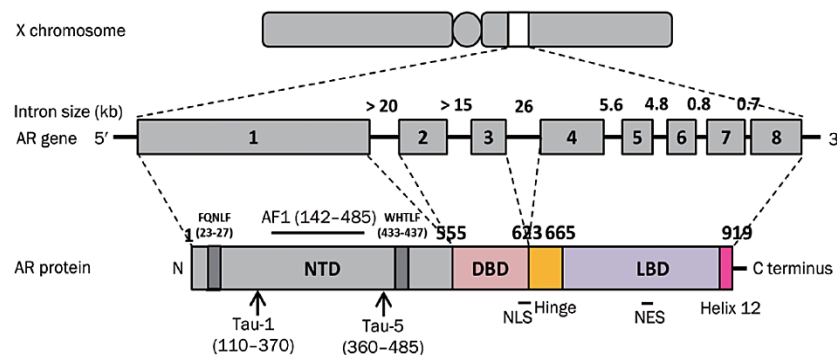


Figura 15. Localización cromosómica de AR, representación esquemática del gen y la proteína AR. (Tan MH et al. *Acta Pharmacol Sin.* 2015).

AR se encuentra en el citoplasma unido a proteínas de choque térmico y otras chaperonas que lo mantienen inactivo en ausencia de ligando. La unión de los andrógenos a LBD provoca un cambio conformacional que conlleva a disociación de las

chaperonas y la exposición de NLS. El complejo AR/andrógeno se transloca al núcleo, dimeriza y se une a la cromatina en una región reguladora de los genes diana conocida como AREs; además recluta a cofactores que participan en la transcripción génica ⁷⁸.

AR juega un papel esencial en la carcinogénesis del PCa y progresión hacia CRPC y constituye una diana terapéutica en el PCa, por ello se han desarrollado anti-androgénicos que bloquean la unión los andrógenos a AR e inhiben la transcripción de genes diana para la proliferación celular. Uno de ellos es la enzalutamida, indicado para el tratamiento de pacientes con CRPC. La enzalutamida actúa como un inhibidor competitivo de AR y puede llevar a cabo su acción en tres niveles distintos de la señalización de AR: inhibe la unión de los andrógenos, inhibe su translocación al núcleo e inhibe su unión al ADN.⁷⁹

El gen AR contiene dos repeticiones polimórficas, CAG y GGC, en el exón 1 que han sido ampliamente estudiadas en relación al riesgo de PCa con resultados controvertidos ya que parece existir una relación inversa entre el nivel de expresión de AR y la longitud de las repeticiones CAG o GGN ⁸⁰. En un reciente meta-análisis que incluyó 61 estudios para CAG y 16 para GGN, las repeticiones cortas de CAG y GGN en el gen AR se asociaron con un incremento del riesgo de PCa, especialmente en caucásicos ⁸¹. Otro SNP del gen AR que ha sido analizados en el PCa es el rs6152. Esta variante también conocida como Stul, ha sido asociada con un incremento del riesgo de PCa metastásico ⁸². Sin embargo, el análisis de rs6152 ha mostrado falta de asociación con la resistencia al tratamiento hormonal ⁸³.

ESR1 y ESR2

Los receptores de estrógenos son receptores hormonales nucleares que actúan como factores de transcripción. El gen ESR1 se localiza en el cromosoma 6, en la región q24-q27. Se trata de un segmento de unos 300 kb, incluye 8 exones y codifica una proteína (ER α) de 595 amino ácidos y 66 kDa ⁸⁴.

El gen ESR2 se encuentra en el cromosoma 22, en la región q22-q24. Abarca 254 kb y está formado por 8 exones que codifican una proteína (ER β) de 530 amino ácidos y 60 kDa ⁸⁴.

A nivel proteico, ambos ERs están subdivididos en cinco dominios funcionales distintos (figura 16): el dominio NTD o A/B (con un 17% de homología de aminoácidos entre ambos ERs); un dominio central C de unión al ADN (DBD) (casi idéntica, 97%); el dominio D o bisagra flexible (36% de homología) que contiene la NLS y la unión del dominio C con el dominio multifuncional carboxi-terminal E. El dominio E corresponde al dominio LBD y muestra un 56% de homología aminoacídica entre los dos ERs. Por último, el dominio F se localiza en el extremo carboxil-terminal de los receptores y comparten un 18% de similitud en amino ácidos (Figura 15).

El dominio NTD alberga la AF-1 con función independiente de ligando y determina la activa específica del promotor así como las interacciones con el co-receptor. El dominio DBD reconoce y se une a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados dentro de las regiones reguladoras de los genes diana. La región bisagra contiene la NLS para la translocación al núcleo del receptor y el dominio LBD sirve para la unión específica a estrógenos y la activación de la actividad transcripcional. Por último, el dominio F participa en la estabilización del receptor y en el reclutamiento de co-activadores ⁴⁵.

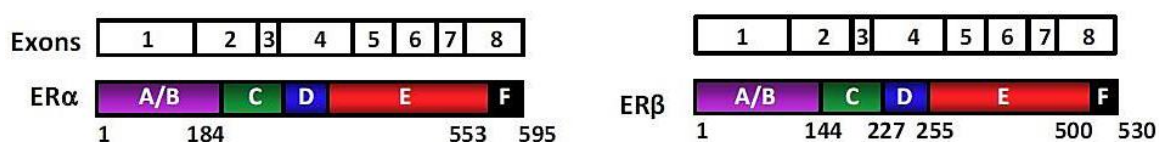


Figura 16. Representación esquemática de los exones de ESR1 y ESR2 y dominios funcionales de las proteínas ERα y ERβ. (Yaşar P et al. *Reprod Med Biol.* 2016).

Tras la unión de los estrógenos tiene lugar un cambio conformacional en ER, se activa y dimeriza, incrementa la fosforilación y se une al ERE en la región promotora de los genes diana ⁴⁵. Las diferencias que presentan en los distintos dominios determinan que ERα y ERβ desencadenen respuestas transcripcionales distintas ⁸⁴.

ERα se expresa principalmente en el útero, en la glándula mamaria, en el músculo esquelético, en el tejido adiposo, en la hipófisis y en el hueso. En cambio, ERβ se encuentra principalmente en el ovario, en la próstata, en el pulmón y en sistemas cardiovascular y nervioso central ⁸⁴.

Debido al efecto de los estrógenos en el crecimiento y carcinogénesis y a la expresión de ER α y β en las células prostáticas, agonistas y antagonistas que bloquean la activación de los ERs han sido empleados en el tratamiento de PCa ⁴⁵.

El análisis de los genes ESR1 y ESR2 ha mostrado la existencia de numerosos polimorfismos en ambos genes.

En el gen ESR1 los SNPs más ampliamente estudiados son PvuII (rs2234693) y XbaI (rs9340799), ambos localizados en el intrón 1. En relación al PCa, los resultados acerca de la asociación de PvuII y XbaI con riesgo de PCa son inconsistentes. Un reciente meta-análisis que incluyó dieciocho estudios de casos-controles ha mostrado una asociación significativa entre los PvuII y XbaI y el riesgo de PCa en caucásicos pero no en asiáticos. Además PvuII se relacionó con valores de Gleason > 7 ⁸⁵. Otra variante del gen ESR1, el rs1062577 ha sido asociada con un mayor riesgo de recurrencia en caucásicos, así como con una peor respuesta a la ADT en asiáticos ⁸⁶.

En el gen ESR2, el rs2987983 localizado en la región promotora, se ha relacionado con el riesgo de PCa en un estudio sueco ⁸⁷. Del mismo modo, el rs1256049 se ha relacionado con el riesgo de PCa en caucásicos y africanos pero no en asiáticos ⁶³.

4.2. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas endógenas de ARN no codificante formadas por entre 18 y 22 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional ⁸⁸. Fueron descritos por primera vez en 1993 en *Caenorhabditis elegans*, pero su trascendencia en los distintos procesos biológicos no comenzó a cobrar importancia hasta que fueron caracterizados en distintas especies ocho años más tarde ⁸⁹. Hasta ahora se han identificado 1181 precursores y 2588 miRNAs maduros en el genoma humano, pero la función biológica de la mayoría de ellos se desconoce por el momento (miRBase 21, www.mirbase.org) ⁹⁰.

4.2.1. Síntesis y mecanismo de acción

En el núcleo, los genes que codifican los miRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II generando transcritos primarios conocidos como pri-miRNAs. El pri-miRNAs es escindido por un complejo microprocesador formado por la enzima Drosha

RNasa (ribonucleasa) III y la proteína de unión a ARN DGCR8, generando una estructura en horquilla de unos 85 nucleótidos llamada pre-miRNA. Tras el transporte por el complejo Ran/GTP/Exportina 5 desde el núcleo al citoplasma, el pre-miRNA es procesado por otra enzima RNasa III llamada Dicer que origina un dúplex de miRNA (miRNA maduro/miRNA pasajero) de unos 20-22 nucleótidos. Una vez el dúplex es desenrollado, el miRNA maduro se incorporará en un complejo proteico llamado RISC. Éste complejo mediará el silenciamiento génico mediante la rotura y degradación del ARNm o mediante su represión translacional dependiendo de la complementariedad entre el miRNA y el ARNm diana. (Figura 17) ⁹¹.

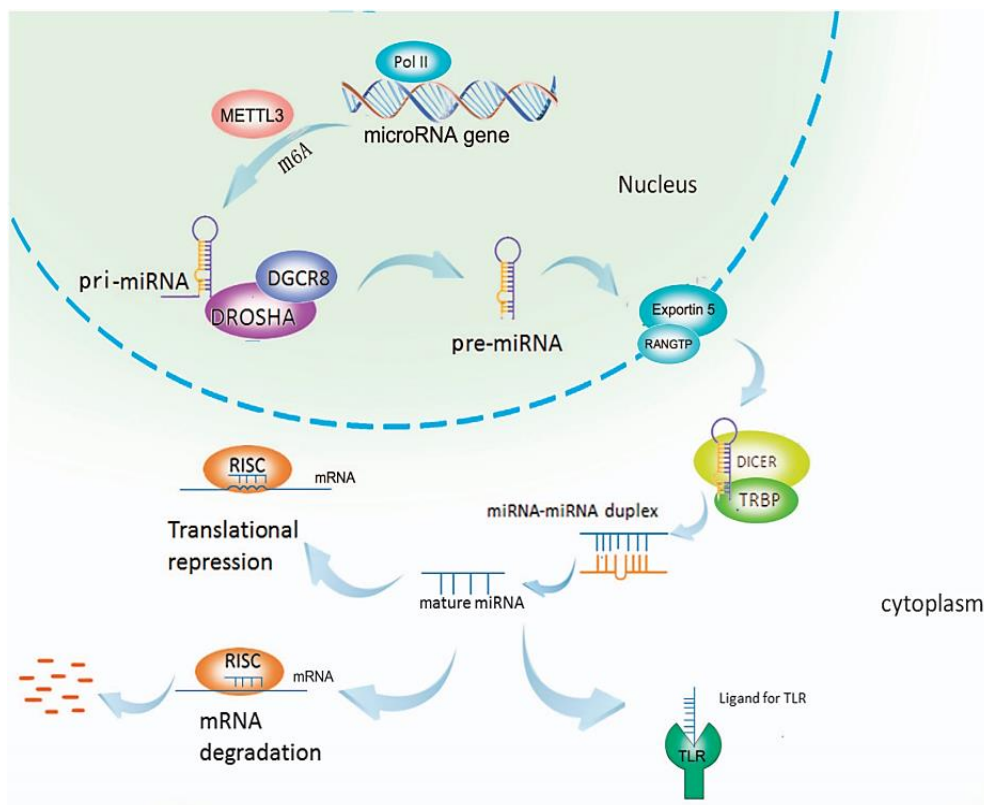


Figura 17. Síntesis y mecanismo de acción de miRNAs. (Peng Y et al. *Signal Transduct Target Ther.* 2016).

Actúan reprimiendo la expresión génica mediante su unión principalmente a la región 3' no traducida (3'UTR) del ARNm y en menor medida a la región 5' no traducida (5'UTR) del mismo ⁸⁸. Aunque se creía que solo silenciaban la expresión de los genes,

diferentes estudios han demostrado que los miRNA pueden funcionar como ligandos para unirse directamente con el receptor tipo Toll (TLR), lo que activa las vías de señalización aguas abajo ⁹¹.

Hasta un 60% de los ARNm podrían estar bajo el control de los miRNAs ⁸⁹. Cada miRNA puede regular la expresión de múltiples ARNm que pueden comprender o no una misma vía de señalización. Por ello, los miRNAs regulan diversos procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación celular, la apoptosis y la desregulación de su expresión puede dar lugar al desarrollo de procesos patológicos como el cáncer ⁸⁹.

4.2.2 Alteración de la expresión de miRNAs en el cáncer

Diferentes mecanismos podrían explicar la alteración de la expresión de los miRNAs en el cáncer. Ésta podría ser debida a alteraciones genéticas como consecuencia de que los genes que codifican los miRNAs suelen localizarse en sitios frágiles de los cromosomas. También podría deberse a mecanismos epigenéticos, pues los miRNA se ubican cerca de islas CpG que son silenciadas mediante metilación del ADN y a defectos en la maquinaria de biogénesis de los miRNAs. Otra posibilidad es que sea debida a mutaciones en las enzimas que participan en su síntesis o a la actividad anormal de los factores de transcripción ⁸⁹. La pérdida de expresión de factores de transcripción supresores de tumores puede derivar en una disminución de la expresión de miRNAs con igual función. Un ejemplo de ello es el factor de transcripción p53 que participa en la regulación del ciclo celular y la apoptosis y se encuentra mutado aproximadamente en el 50% de los tumores ⁸⁹. P53 controla la expresión de diferentes miRNAs como la familia miR-34. Diferentes autores han mostrado como la expresión de miR-34-a disminuye en tumores de colon, ovarios o próstata donde AR se encuentra bajo el control transcripcional de este miRNA ⁹².

Los miRNAs se encuentran involucrados en los procesos cancerígenos ya sea como oncogenes o como supresores de tumores, en función de sus genes diana ⁹¹. Los miRNAs sobreexpresados suelen actuar como “onco-miRs”, reprimiendo a genes supresores de tumores. Mientras, los miRNAs reprimidos, suelen funcionar como supresores tumorales regulando negativamente a los oncogenes. Pero el papel que juega

cada miRNA en la oncogénesis depende del entorno en el que se encuentre, prueba de ello es que un mismo miRNA puede encontrarse sobreexpresado en un tipo de cáncer y reprimido en otro. Así por ejemplo, el miR-29 que actúa como onco-miR en el cáncer de mama y como supresor de tumores en el cáncer de pulmón⁸⁹.

Los miRNAs se presentan como candidatos a biomarcadores gracias a su baja complejidad, su alta estabilidad y resistencia a las condiciones de almacenamiento y su fácil accesibilidad. Ya que además de encontrarse en los tejidos, se localizan en diferentes fluidos como la sangre, la orina, el semen, las lágrimas o la leche materna. Pueden encontrarse a su vez incluidos dentro de vesículas extracelulares (exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos); o formar complejos mediante su asociación con proteínas argonauta (aproximadamente un 90% de los miRNAs liberados en los biofluidos). Además pueden ser fácilmente detectados y cuantificados con técnicas estándar empleadas habitualmente como la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) o microarray⁹³.

4.2.3. Papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer de próstata

Los miRNAs juegan un papel crítico en el PCa mediante la regulación de la expresión de las proteínas involucradas en la vía de señalización de AR, en el ciclo celular, en la apoptosis, en la transición epitelio mesénquima (EMT) y metástasis⁹⁴ (Figura 18) .

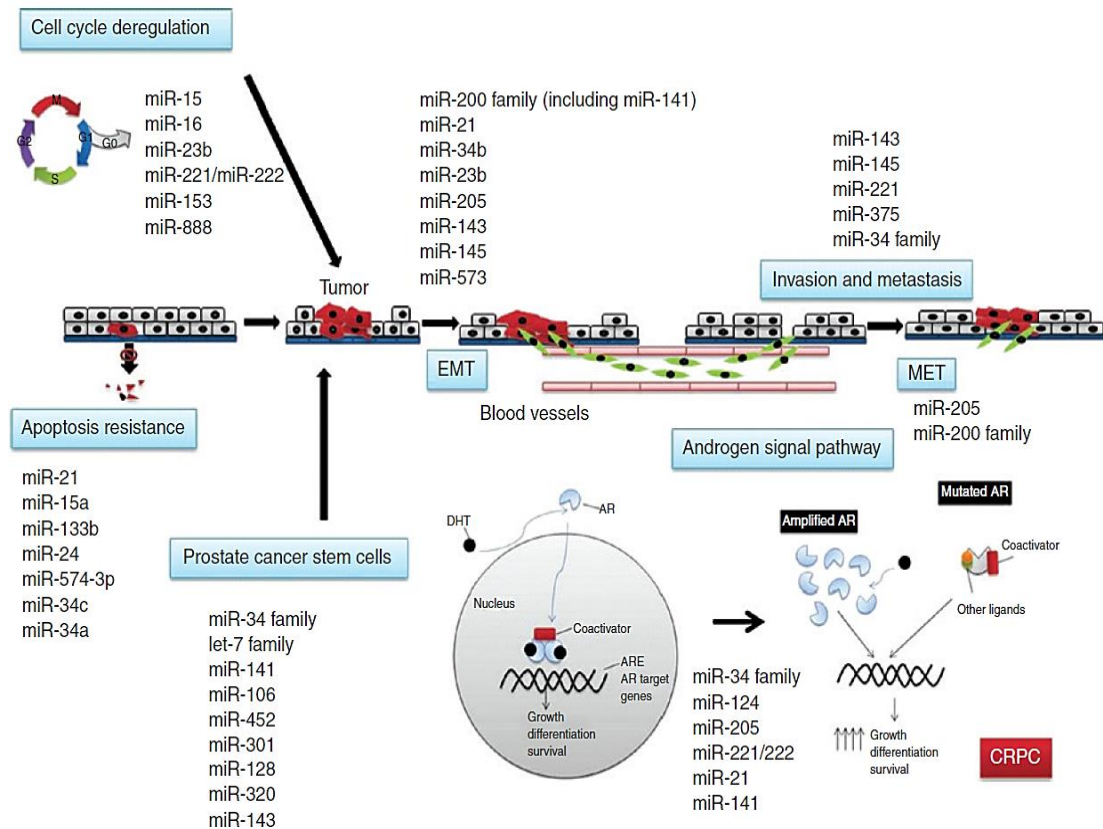


Figura 18. Papel de los miRNAs en la patogénesis en el PCa. (Filella X et al. *Clin Chem Lab Med.* 2017).

Numerosos miRNAs regulan la señalización de AR. Por ejemplo, miR-21, miR-31, miR-34 y miR-141 pueden regular la expresión de AR, pero al mismo tiempo, AR puede regular la expresión de miR-21, miR-27a, miR-34, miR-125b, miR-221 y let-7⁹⁴.

La familia miRNA-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429), miR-573 y miR-375 participan en la regulación del proceso EMT mediante la represión de marcadores mesenquimales y la regulación positiva de marcadores epiteliales. La transición epitelio-mesénquima es un proceso que permite a las células epiteliales polarizadas asumir un fenotipo mesenquimal, que les confiere un incremento de la capacidad migratoria, de la invasividad y de generar metástasis⁹⁴.

Así pues, la identificación de nuevos miRNAs desregulados en el PCa, de sus funciones biológicas y de sus genes diana, incrementarán nuestro conocimiento del papel que juegan los miRNAs en la tumorigénesis y su desarrollo como biomarcadores en el PCa.

4.2.4. miRNAs como biomarcadores en el cáncer de próstata

Los perfiles de expresión de miRNAs en PCa podrían ser útiles para el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento de la enfermedad.

En 2010 se llevó a cabo el primer estudio a gran escala para estudiar los perfiles de expresión de miRNAs en PCa y su relación con el diagnóstico. Al comparar la expresión en el tejido prostático tumoral frente al tejido prostático normal adyacente se identificaron 15 miRNAs diferencialmente expresados, los miRNAs (miR-16, miR-31, miR-125b, miR-45, miR-149, miR-181b, miR-184, miR-205, miR-221 y miR-222) fueron silenciados en el tejido tumoral mientras que los miRNAs (miR-96, miR-182, miR-182*, miR-183 y miR-375) fueron sobreexpresados ⁹⁵.

Diversos grupos han identificado firmas de miRNAs diferencialmente expresados entre pacientes con PCa y pacientes con BPH que podrían discriminar estos dos tipos de enfermedades evitando así la realización de biopsias innecesarias ⁹⁶ (ver Tabla 5). Por ejemplo, *Sharova* y colaboradores han realizado recientemente un perfil de miRNA en el plasma en pacientes con un PSA elevado diagnosticados con PCa localizado o BPH mediante biopsia. Las proporciones miR-106a/miR-130b y miR-106a/miR-223 fueron significativamente distintas entre ambos grupos así como más sensibles y específicas que el PSA para discriminar entre PCa y BPH ⁹⁷.

Tabla 5. miRNAs asociados con el diagnóstico de PCa. (*Cannistraci A et al. Biomed Res Int. 2014*).

References	Sample type	miRs deregulated	miRs selected as candidate biomarkers
Taylor et al. (2010) [24]	113 PCa tissues 28 normal tissues	Large screening study	Taylor et al. 10.1016/j.ccr.2010.05.026
Volinia et al. (2006) [31]	56 PCa tissues 7 normal tissues	39 upregulated 6 downregulated	Volinia et al. 10.1073/pnas.0510565103;
Ambs et al. (2008) [32]	60 microdissected tumor tissues 16 normal tissues	21 upregulated 21 downregulated	miR-32, miR-26a, miR-181a, miR-93, miR-196a, miR25, miR-92 and let-7i ↑
Porkka et al. (2007) [38]	5 hormone-naïve PCa tissues 4 HRPC tissues 4 BPH tissues	14 upregulated 37 downregulated	PCa: miR-16, miR-99 and let-7 family ↓ HRPC: miR-205, miR-100 and miR-30 ↓
Ozen et al. (2008) [43]	16 PCa tissues and 10 normal tissues	9 upregulated 76 downregulated	Let-7, miR-30, miR-16 ↓
Martens-Uzunova et al. (2012) [44]	102 PCa tissues and normal adjacent tissues	54 deregulated	miR-205 ↓

Larne et al. (2013) [45]	49 PCa tissues 25 normal tissues	7 deregulated	miR-96-5p, miR-183-5p miR-145-5, miR-221-5p (combined in miQ score)	↑ ↓
Moltzahn et al. (2011) [46]	Serum samples from PCa (n = 36) and HD (n = 12)	6 upregulated 4 downregulated	miR-20b, miR-874, miR-1274a, miR-1207-5p, miR-93, miR-106a miR-223, miR-26b, miR-30c, miR-24	↑ ↓
Bryant et al. (2012) [48]	Plasma samples from PCa (n = 78) and HD (n = 28) Urine samples from PCa (n = 118) and HD (n = 17)	12 deregulated	miR-107, miR-574-3p	↑
Srivastava et al. (2013) [49]	40 PCa tissues and 40 normal adjacent tissues. Urine samples from PCa (n = 36) and HD (n = 12)	2 downregulated	miR-205, miR-214	↓
Haj-Ahmad et al. (2014) [50]	Urine samples from PCa (n = 8) BPH (n = 12) patients and HD (n = 10)	17 deregulated (only 7 selected for further analysis)	miR-1825 (only in PCa) miR-484 (in PCa and BPH)	↑ ↓
Schaefer et al. (2010) [54]	76 PCa and adjacent normal tissues	5 upregulated 10 downregulated	miR-96, miR-182, miR-182* miR-183 and miR-375 miR-16, miR-31, miR-125b, miR-145, miR-149, miR-181b, miR-184, miR-205, miR-221, miR-222	↑ ↓

PCa: prostate cancer; HRPC: hormone refractory prostate cancer; BPH: benign prostatic hyperplasia; HD: healthy donors, FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded.

De igual manera, el análisis de expresión de miRNAs podría servir para identificar los diferentes grados de agresividad con los que se manifiesta la enfermedad o para predecir una recaída de ésta ⁹⁶ (Ver Tabla 6). Tal es el caso, del panel formado por los miRNAs circulantes miR-375, miR-378* y miR-141 que han mostrado un incremento de expresión con la progresión de la enfermedad y el miR-409-3p sobreexpresado en los pacientes de alto riesgo en comparación con los de bajo riesgo ⁹⁸ o los miRNAs (miR-21, -200a, -145, -30d, -301a, -449b y -182), evaluados en tejido y asociados a recurrencia bioquímica tras prostatectomía radical ⁹⁹.

Tabla 6. miRNAs asociados con el pronóstico de PCa. (Cannistraci A et al. *Biomed Res Int.* 2014).

References	Sample type	Clinical parameters	miRs deregulated	miRs selected as candidate biomarkers
Taylor et al. (2010) [24]	113 PCa tissues 28 normal tissues	Large screening study		Taylor et al. 10.1016/j.ccr.2010.05.026
Martens-Uzunova et al. (2012) [44]	102 PCa tissues and normal adjacent tissues	High risk biochemical recurrence	12 upregulated 13 downregulated	miR-19a, miR-130a, miR-20a/106/93 miR-27, miR-143, miR-221/222 ↑ ↓
Tong et al. (2009) [53]	40 FFPE prostatectomy Specimens (20 without early BCR 20 with early BCR)	Biochemical recurrence	2 upregulated 4 downregulated	miR-135, miR-194 (40% of case) miR-145, miR-221, miR-222 ↑ ↓

Schaefer et al. (2010) [54]	76 PCa and adjacent normal tissues	Biochemical recurrence	5 upregulated 10 downregulated	miR-96	↑
Hulf et al. (2013) [55]	149 PCa and 30 matched normal tissues	Biochemical recurrence	1 downregulated	miR-205	↓
Schubert et al. (2013) [62]	BCR tissues and disease-free tissues	Biochemical recurrence	2 downregulated	let-7b and let-7c	↓
Leite et al. (2011) [66]	21 frozen BCR tissues 28 frozen disease-free tissues	Biochemical recurrence	4 upregulated	miR-100	↑
Karatas et al. (2014) [72]	82 PCa tissues (41 BCR and 41 disease-free)	Biochemical recurrence	3 downregulated	miR-1, miR-133b	↓
Selth et al. (2013) [102]	Serum samples from PCa patients (BCR = 8) disease-free = 8)	Biochemical recurrence	3 upregulated	miR-194 miR-146-3p	↑
Shen et al. (2012) [87]	Plasma samples from PCa (<i>n</i> = 82)	Castration resistance	2 upregulated	miR-21, miR-145	↑
Jalava et al. (2012) [90]	28 primary PCa tissues 14 CRPC tissues 12 BPH tissues	Castration resistance	4 upregulated 3 downregulated	miR-32, miR-148a, miR-590-5p, miR-21 miR-99a, miR-99b, miR-221	↑ ↓
Peng et al. (2011) [94]	6 primary PCa tissues 7 bone metastatic tissues	Metastasis	5 downregulated	miR-508-5p, miR-143, miR-145, miR-33a, miR-100	↓
Saini et al. (2011) [95]	36 PCa tissues 8 metastatic tissues 8 normal tissues	Metastasis	1 downregulated	miR-203	↓
Mitchell et al. (2008) [19]	Serum samples from metastatic PCa (<i>n</i> = 25) and age-matched HD (<i>n</i> = 25)	Metastasis	6 deregulated	miR-141	↑
Brase et al. (2011) [100]	Serum samples from localized PCa (<i>n</i> = 14) and metastatic PCa (<i>n</i> = 7)	Metastasis	5 upregulated	miR-141, miR-375	↑
Bryant et al. (2012) [48]	Serum samples from PCa (<i>n</i> = 72) and metastatic PCa (<i>n</i> = 47) Plasma samples from PCa (<i>n</i> = 55) and metastatic PCa (<i>n</i> = 24)	Metastasis	2 upregulated	miR-141 and miR-375	↑
Nguyen et al. (2013) [103]	Serum samples from localized PCa (<i>n</i> = 58) and metastatic CRPC (<i>n</i> = 26)	Castration resistance	3 upregulated 1 downregulated	miR-141, miR-375, miR-378* miR-409-3p	↑ ↓
Zhang et al. (2011) [88]	Serum samples from localized PCa (<i>n</i> = 20), ADPC (<i>n</i> = 20), CRPC DTX treated (<i>n</i> = 10) and BPH (<i>n</i> = 6)	Castration resistance	1 upregulated	miR-21	↑

FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded, BCR: biochemical recurrence, Pca: prostate cancer, CRPC: castration resistant prostate cancer, BPH: benign prostatic hyperplasia, HD: healthy donors.

En base a las numerosas investigaciones que han asociado a los miRNAs, miR-141 y miR-375 con el pronóstico en el PCa, ambos han sido elegidos para este estudio.

4.2.4.1. miR-141 y miR-375

Los miR-141 y miR-375 han sido propuestos entre los miRNAs más prometedores para el diagnóstico y pronóstico del PCa. Ambos se encuentran sobreexpresados en tejido protático tumoral respecto al tejido prostático sano ¹⁰⁰. Además parecen ser capaces de diferenciar tumores localizados y tumores metastásicos ya que en un estudio realizado por *Nguyen* y colaboradores, los pacientes con mCRPC mostraron mayores niveles de

miR-141 y miR-375 en el suero que los pacientes con PCa de bajo riesgo ⁹⁸. Brase y colaboradores ¹⁰¹ obtuvieron resultados similares, ya que hallaron niveles de miR-141 y miR-375 elevados en el suero de pacientes metastásicos comparados con los no metastásicos. Igualmente demostraron la sobreexpresión de estos miRNAs en pacientes que presentan tumores con mayor puntuación de Gleason, lo que indica su potencial uso como biomarcadores en el pronóstico y diagnóstico de la enfermedad.

miR-141, pertenece a la familia miR-200 y forma un *cluster* junto miR-200c que se localiza en el cromosoma 12 ⁹⁰. miR-141 promueve la actividad transcripcional de AR y la proliferación celular mediante la represión de Shp, un co-represor de AR ¹⁰². Sin embargo, a pesar de encontrarse sobreexpresado en tumores metastásicos, hay estudios que indican que también participa en la regulación del EMT reprimiendo la expresión de marcadores mesenquimales como ZEB1 y VIM y promoviendo la expresión de marcadores epiteliales ¹⁰².

miR-375 se encuentra en el cromosoma 2 entre los genes CRYBA2 y CCDC108 ⁹⁰. Si bien, su expresión está frecuentemente elevada en PCa, no está claro el papel que juega. La sobreexpresión de miR-375 en las células PC3 (células de PCa) induce la expresión de marcadores epiteliales, reprime la expresión de marcadores mesenquimales e inhibe la invasión *in vitro*. Además ZEB1 reprime la expresión de miR-375 ¹⁰². Por otra parte, miR-375 podría actuar como promotor de la proliferación celular. En un estudio *in vitro* llevado a cabo en líneas celulares de PCa, miR-375 reprimió la expresión Sec23A, lo cual resultó en un incremento de la proliferación celular ¹⁰³.

4.2.4.2. Controles endógenos para el estudio de miRNAs en cáncer de próstata.

El análisis de expresión de los miRNAs normalmente se realiza mediante una RT-qPCR ⁹³. Al realizar la RT-qPCR pueden producirse variaciones técnicas entre las reacciones en los diferentes pasos del procedimiento (en el procesamiento de las muestras; en el procedimiento de extracción del ARN, en la calidad del ARN y en la eficiencia de la retrotranscripción). Por ello los datos deben normalizarse mediante la incorporación de un gen de control endógeno en el experimento (conocido como normalizador o *housekeeping*) ¹⁰⁴. La expresión de la mayoría de los ARNs cambia con el tipo celular y las condiciones, por lo que no existe un control endógeno universal. Por lo tanto, para

cada conjunto de muestras de un tejido determinado debería evaluarse el gen de control más específico. Dicha elección es importante, ya que dependiendo del tejido de estudio, la expresión del control endógeno puede ser inestable entre las muestras, lo que puede llevar a resultados inexactos ¹⁰⁴.

Tradicionalmente el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y el rRNA 18s han sido usados comúnmente como genes normalizadores en RT-qPCR ¹⁰⁵. Además también son usados RNAs nucleolares pequeños (snRNAs) como controles en estudios de miRNAs ¹⁰⁴. El RNA nucleolar pequeño RNU6B, es uno de los controles endógenos más empleados para los análisis de expresión de miRNAs ¹⁰⁶ y un buen candidato para el estudio en muestras de próstata ¹⁰⁷. Junto a él, el miR-130b ⁶⁰ o el RNU24 ⁶² han sido propuestos como normalizadores para el análisis de la expresión de miRNAs en el PCa en tejido. Sin embargo, otros estudios indican que RNU6B y miR-130b no son controles endógenos estables ya que muestran variación en la expresión entre muestras ¹⁰⁴. Además miR-130b parece actuar como un miRNA supresor de tumores en PCa, ya que su expresión es reprimida en tejido y líneas celulares de PCa ¹⁰⁸.

Basándonos en ello, evaluaremos a GAPDH, RNU6B y miR-130b como normalizadores de la expresión de miRNAs en tejido de PCa en nuestro estudio.

HIPÓTESIS

Los estudios publicados hasta el momento han identificado diversos SNPs asociados con un mayor riesgo de PCa y con capacidad de predecir la respuesta al tratamiento en pacientes con PCa. Sin embargo, apenas hay estudios que evalúen su relación con la agresividad de la enfermedad.

Dada la implicación directa en el PCa de los esteroides sexuales, en especial de los andrógenos, variantes genéticas en genes que participan en su síntesis y metabolismo podrían modificar la actividad de las enzimas que codifican, así como los niveles de precursores esteroideos. Estas variaciones podrían tener una influencia en el desarrollo y severidad de la enfermedad.

Bajo esta hipótesis, en este trabajo analizamos 9 SNPs en genes vinculados al metabolismo de los andrógenos y estrógenos y su relación con el riesgo, agresividad y respuesta al tratamiento en el PCa

Por otra parte, diversos estudios han demostrado la alteración de la expresión miRNAs en el PCa y su potencial uso en el diagnóstico y seguimiento del estado de la enfermedad. Evidenciando la identificación de miRNAs diferencialmente expresados en cada una de las fases de ésta.

Debido al papel de los oncomiRs en la progresión de la enfermedad y a su frecuente sobreexpresión, podría producirse un incremento de ésta en tumores más agresivos frente a los más indolentes.

Siguiendo esta premisa, en este trabajo analizamos la expresión de miRNAs previamente asociados con proliferación celular y progresión del PCa en biopsias prostáticas de pacientes con PCa.

OBJETIVOS

1. Evaluar el papel de variantes genéticas en genes implicados en la síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en el PCa.
 - Analizar las diferencias genotípicas entre la población control y la población de pacientes con PCa.
 - Analizar la relación de las variantes genéticas con distintas variables clínicas en el momento de diagnóstico.
 - Determinar la influencia de las variantes genéticas en la supervivencia libre de enfermedad.

2. Analizar la expresión de miRNAs en pacientes con PCa, tratando de vincular el patrón de expresión con la agresividad de la enfermedad.
 - Identificar el control endógeno más apropiado para la normalización de los miRNAs de estudio entre los candidatos RNU6B, miR-130b y GAPDH.
 - Analizar la relación de expresión de miR-141, miR-375 y miR-130b con distintas variables clínicas en el momento de diagnóstico.
 - Analizar la relación de expresión de miR-141, miR-375 y miR-130 con la supervivencia libre de enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Todos los pacientes que participaron en los estudios fueron reclutados entre los años 2012 y 2014 en las consultas externas del Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Para participar en el estudio firmaron un consentimiento informado, el cual fue previamente aprobado por el comité ético del hospital.

La cohorte incluyó individuos caucásicos sospechosos de PCa con un PSA >4 ng/ml e indicación de biopsia prostática diagnóstica. Aquellos individuos con biopsia diagnóstica positiva pasaron a formar parte del grupo de pacientes con PCa. Mientras, que aquellos individuos cuya biopsia diagnóstica fue negativa para carcinoma de próstata constituyeron el grupo control del estudio.

Durante el reclutamiento de tanto de los pacientes como de los controles se recogió información clínica relevante que incluyó edad, nivel de PSA y estado de la biopsia, así como el estadio T, la puntuación de Gleason y el riesgo de D'Amico solo para los pacientes con PCa.

Así mismo, a los pacientes se les hizo un seguimiento de la enfermedad durante un periodo de 54 meses en el que se evaluó la aparición de recurrencia bioquímica o recidiva del PSA tras el tratamiento. La concentración de PSA que determina el fracaso del tratamiento difiere en función de la terapia. Según las guías europeas, para una prostatectomía radical, dos valores consecutivos de PSA de 0.2 ng/ml o más representan un cáncer recidivante. El fracaso de la radioterapia consiste en un incremento de 2ng/ml del valor mínimo (nadir) de PSA tras el inicio del tratamiento²⁴. En el caso de la ADT, el fracaso se denomina CRPC. Éste consiste en tres determinaciones consecutivas de PSA, dos de ellas por encima del 50% del PSA nadir, y al menos un PSA por encima de 2 ng/ml, siempre con testosterona < 50 ng/dl.

2. TIPO DE MUESTRAS

a) Sangre periférica:

La sangre periférica contiene células mononucleares que protegen al ADN de la degradación enzimática y sirven como fuente de ADN para el estudio de los polimorfismos.

Las muestras de sangre de los pacientes fueron extraídas en el momento del diagnóstico mediante punción venosa, y depositadas en tubos DB Vacutainer™ que contienen anticoagulante EDTA, por el personal de enfermería del hospital. Posteriormente fueron alicuotadas en tubos de 2 ml y almacenadas a -20°C hasta su uso.

b) Tejido fresco:

El tejido tumoral puede exhibir patrones de expresión de miRNAs alterados, por ello el tejido prostático se empleó para el aislamiento y estudio de miRNAs.

Las muestras de tejido prostático de los pacientes fueron obtenidas mediante Biopsia Transrectal Ecodirigida de próstata (Figura 19). Para ello se introdujo una sonda ecográfica unida a una aguja y utilizando de guía el ecógrafo se realizaron 20 punciones con las que se obtuvieron los cilindros de tejido de la sección de la próstata para determinar la presencia o ausencia tumoral. Dos de los cilindros obtenidos se usaron para nuestro análisis, los cuales fueron congelados a -80 °C hasta su uso.

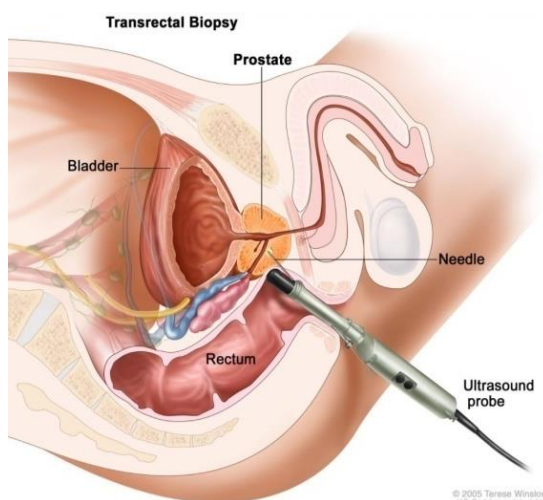


Figura 19. Biopsia transrectal ecodirigida de próstata. (*Prostate Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version. NCI.*)

3. ANÁLISIS DE SNPs

3.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica

Se realizó una extracción orgánica mediante el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) con una digestión previa con buffer de lisis, proteinasa K y 1,4-Dithiothreitol (DTT).

Para conocer en detalle el método de extracción orgánica de ADN ir al anexo 1.

A continuación, el ADN extraído fue cuantificado mediante el *NanoDrop™ 2000c* (Thermo Scientific, Wilmington, DE) un espectrofotómetro ultravioleta visible que sirve para la medir la concentración y determinar la pureza de ácidos nucleicos y proteínas. Para determinar la concentración de ADN se midió la absorbancia una longitud de onda a 260 nanómetros (nm). La pureza se estableció a partir de la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm (ratio A260/A280). En general se considera que el ADN es puro cuando el ratio A260/A280 se encuentra en torno a 1.8. Si es la relación A260/A280 es baja (< 1.6), la muestra de ADN puede estar contaminada por proteínas o fenoles.

3.2. Genotipado mediante sondas *TaqMan® MGB*

Los análisis de genotipado nos permiten determinar variaciones en la secuencia de un solo nucleótido (SNP) e identificar si una muestra desconocida es homocigota (para un alelo u otro) o heterocigota en ese punto determinado.

Los nueve SNPs de estudio (rs6152, rs9332969, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 y rs1256049) se genotiparon mediante sondas *TaqMan® MGB* (Applied Biosystems, Foster City, CA) que consiste en una PCR a tiempo real (qPCR) y una detección de punto final de las señales fluorescentes resultantes, realizadas en el sistema de *7900HT Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los ensayos de genotipado o discriminación alélica de Applied Biosystem empleados contienen dos sondas *TaqMan® MGB*, una sonda marcada con un fluorocromo VIC unido al extremo 5' del alelo 1 y una sonda marcada con un fluorocromo FAM unido al extremo 5' del alelo 2. Solo aquella sonda que presenta la secuencia alélica

complementaria a la secuencia de ADN de la muestra de estudio será rota y emitirá fluorescencia indicando que alelos están presentes en dicha muestra (Figura 20).

La emisión de fluorescencia del fluorocromo VIC, indica homocigosis para el alelo 1; la emisión de fluorescencia del fluorocromo FAM, indica homocigosis para el alelo 2 y la emisión de fluorescencia de ambos fluorocromos indica heterocigosis en ese punto de la secuencia.

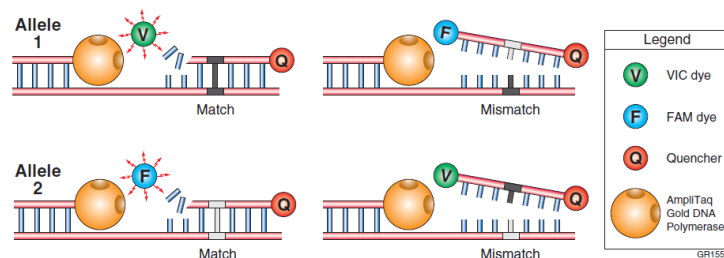


Figura 20. Compatibilidad e incompatibilidad entre alelos y secuencias de sondas en ensayos de discriminación alélica. (Applied Biosystem).

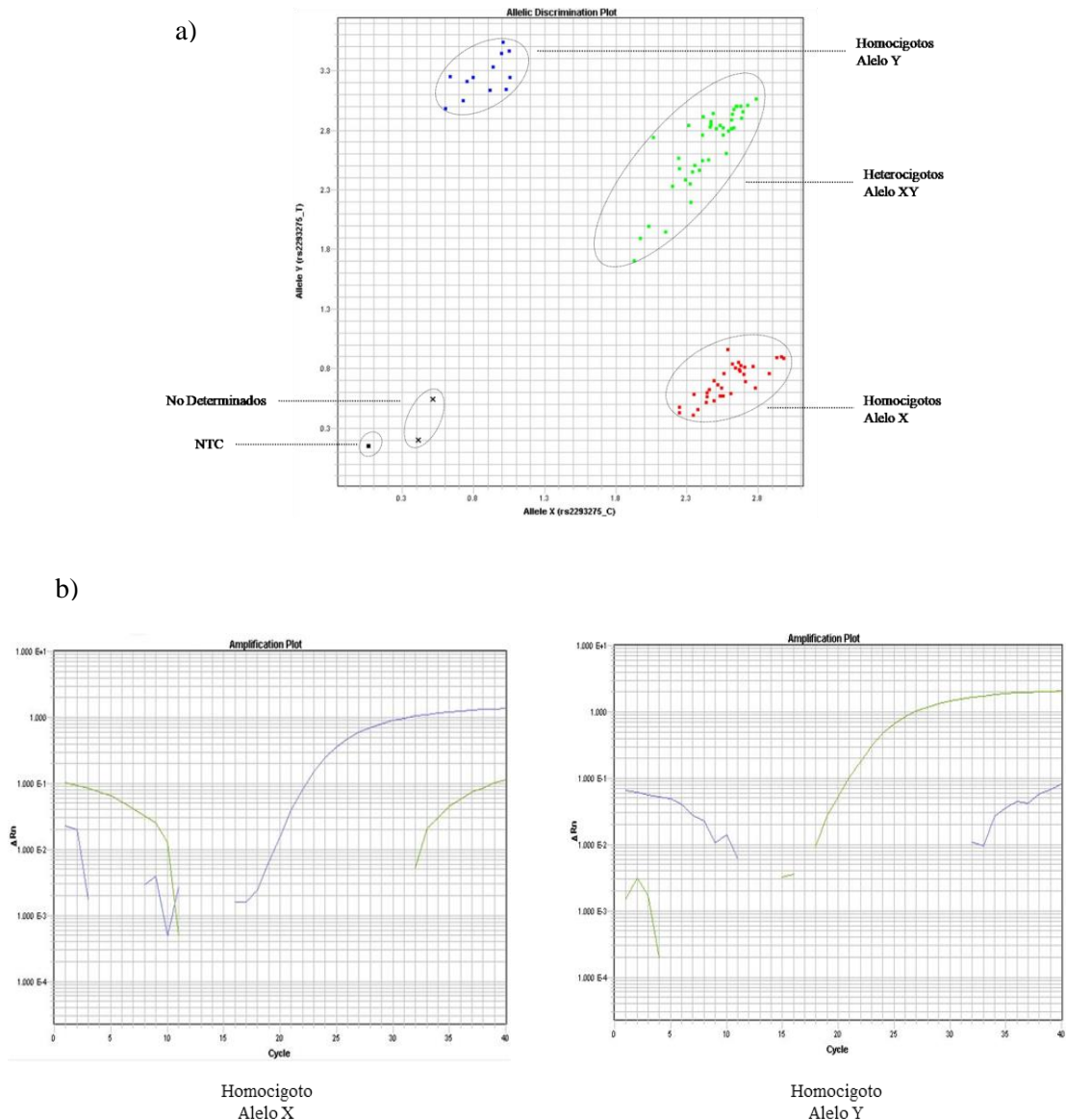
Para la reacción se necesitan los siguientes reactivos por pocillo:

- ADN genómico previamente purificado.
- 2X *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix*. Contiene *AmpliTag Gold*[®] DNA Polimerasa, una mezcla de componentes optimizada para una discriminación de alelos específica, *ROX*[™] *Passive Reference* (para normalizar diferencias entre pocillos debidas a artefactos) y Buffers.
- 20X *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (específico para cada SNP). Contiene dos primers (forward y reverse) con la secuencia para la región de interés a amplificar y dos sondas *TaqMan*[®] *MGB* marcadas cada una con el fluorocromo VIC o FAM.
- H₂O libre de DNasas.

En cada uno de los análisis se añadió un control negativo (NTC) que contiene todos los componentes de la reacción excepto ADN y tres controles positivos con genotipo conocido (homocigoto para cada uno de los alelos y heterocigoto). Las condiciones de

amplificación fueron las siguientes: 50°C durante 2 minutos (1 ciclo); 95°C durante 10 minutos (40 ciclos); 95°C durante 15 segundos (1 ciclo); 60°C durante 1 minuto (1 ciclo) y mantenimiento a 4°C.

Una vez finalizada la amplificación realizamos una lectura de punto final de las señales de fluorescencia recogidas durante el transcurso de ésta y analizamos los resultados con el *Allelic Discrimination (AD) Plate Document* que determina que combinación de alelos está presente en cada muestra en base a la señal de fluorescencia emitida por el pocillo. Para las muestras dudosas o sin determinar, analizamos los resultados del *Standard Curve (AQ) Plate Document* que recoge las curvas de amplificación a tiempo real (Figura 21).



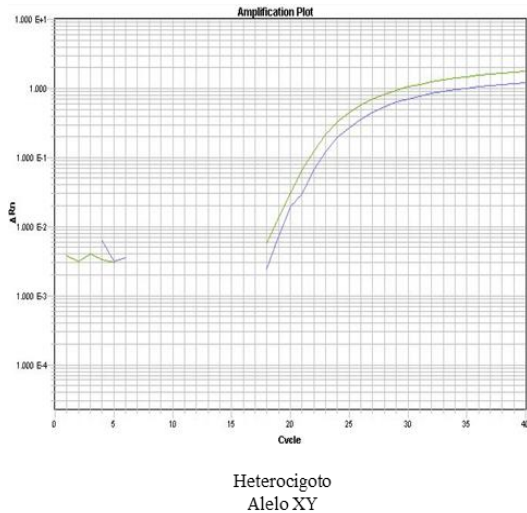


Figura 21. Identificación alélica de las muestras mediante el AD Plate Document (a) y el AQ Plate Document (b).

3.3 Validación del Genotipado por Secuenciación

La validación es necesaria para demostrar que el método empleado funciona correctamente y que no se obtuvieron falsos positivos por la contaminación cruzada de las muestras. Con este objetivo, un 3% de las muestras para cada SNP fueron seleccionadas al azar y secuenciadas.

La secuenciación Sanger, fue la técnica empleada para validar los resultados de genotipado obtenidos mediante sondas *TaqMan*[®] *MGB*. La secuenciación permite conocer la posición exacta de los nucleótidos en la cadena de ADN y por lo tanto nos permite saber que alelos ocupan la posición de cada SNP.

Antes de realizar la técnica de secuenciación es necesario realizar una amplificación de la región en la que se encuentra el polimorfismo y una purificación de los productos amplificados.

3.3.1 Amplificación

Para amplificar la región de ADN en la que se encuentra el polimorfismo se diseñaron primers para cada uno de los SNPs mediante el programa Primer3 (v.0.4.0) (Tabla 7) y utilizó *AmpliAq Gold*[™] *360 Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La amplificación se llevó a cabo en el *Veriti*[™] *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 5 minutos (1 ciclo); 95°C durante 15 segundos, 61°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto (35 ciclos); 72°C durante 7 minutos (1 ciclo) y mantenimiento a 4°C.

Tabla 7. Características de los primers empleados para la amplificación

SNP	Tamaño (pb)	Primer Foward	Primer Reverse
rs6152	461	CTCCGGACGAGGATGACTC	CTGTTCCCCTGGACTCAGAT
rs9332969	501	GGGGTCAAGTCTGTGGTCAG	ACTCAAAGCCAGAGGGGAAT
rs743572	441	TATGCATATGGCCGTGTCTG	CTGGGCTCCAGGAGAATCTT
rs6162	441	GAGGAGATGGGCACCACTTA	TCCTTGTGCCCTAGAGTTGC
rs6163	441	GAGGAGATGGGCACCACTTA	TGGCTCTCTTGCTGCTTACC
rs1004467	385	AAGAATGGGGACCCTGAGTT	GCAGAGAAATGGCAAAGGTT
rs2293275	441	GACAATGGTGCAGAACGAGA	CTTGATGCCAATTGCAAAGA
rs1062577	441	TGCTCTGTTTCCAACCTGCAT	GAATGCAAAGGGGTCTGTGT
rs1256049	441	TCAACTCCCTAATGGTTTGTGTT	GCCCTGCAAGTGTGAGATTT

Pie de Tabla 7. Abreviaturas usadas: pb (pares de bases); TM (temperatura de melting)

Seguidamente, la calidad de los amplicones se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 22).

**Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.**

3.3.2 Purificación

Antes de llevar a cabo la visualización de los resultados, las muestras de ADN amplificadas fueron purificadas (eliminando los restos de primers, nucleótidos y enzimas que pueden interferir en el proceso de secuenciación). Para ello se empleó el *MicroElute[®] Cycle-Pure Kit Centrifugation* (Omega Bio-tek, Norcross, GA). La concentración y pureza de las muestras amplificadas fueron determinadas en el *NanoDrop[™] 2000c*.

Una vez amplificadas las secuencias en las que se encuentran los polimorfismos y purificadas, se procedió a su secuenciación por Sanger.

3.3.3 Secuenciación Sanger

La secuenciación se llevó a cabo mediante la combinación de los kits *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reacción de secuenciación tuvo lugar en el Veriti[™] Thermal Cycler.

Además se preparó un control de secuencia que sirve para confirmar que el procedimiento ha ocurrido correctamente. Las condiciones de la amplificación fueron: 98°C durante 3 minutos (1 ciclo); 96°C durante 15 segundos, 50°C durante 1 minuto y 60°C durante 2 minutos (35 ciclos) y mantenimiento a 4°C.

Una vez secuenciadas las muestras se necesitan varios pasos adicionales para visualizarlos los resultados. Éstos son la purificación del ADN secuenciado mediante el kit *Performa[®] DTR V3 96-Well Short Plates* (EdgeBio, Gaithersburg, MD) y la electroforesis capilar para la visualización de los resultados.

3.3.3.1 Electroforesis capilar

Los productos de secuenciación fueron separados por electroforesis en base a su tamaño con el sistema *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Durante la migración de los productos por el capilar del sistema, un láser incide sobre ellos, lo que provoca la excitación de los distintos fluorocromos a los que van unidos las

bases (A, T, G y C) y la emisión de fluorescencia en una longitud de onda distinta que es recogida por un detector. El *Software SeqScape*[®] del sistema convierte la señal fluorescente en datos digitales para su análisis en el *Sequence Scanner Software v2.0* (Applied Biosystem, Foster City, CA) (Figura 23).

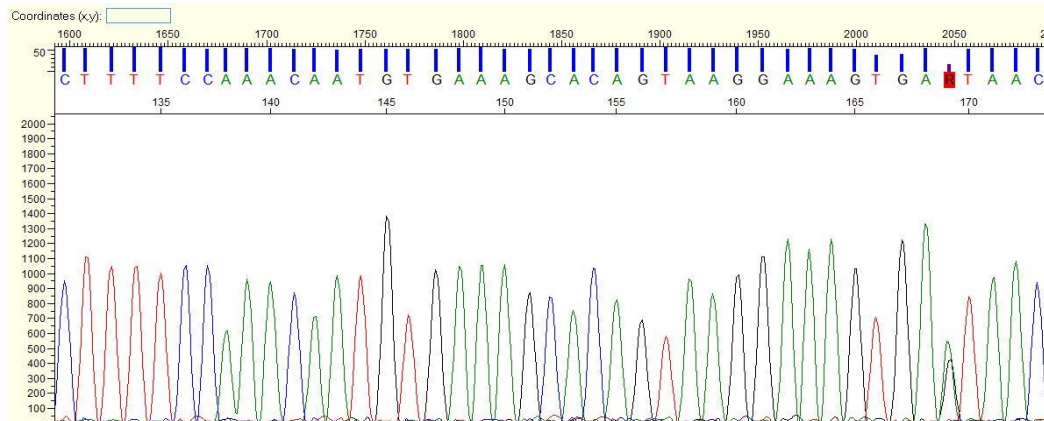


Figura 23. Análisis de una secuencia en el *Sequence Scanner Software v2.0*.

3.4. Tratamiento estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico y la presentación de los resultados se emplearon el paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Inc, Armonk, NY) y el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). En primer lugar se hizo un análisis descriptivo de las variables clínicas y de las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs en la población (media+desv. y/o frecuencias y porcentajes). Las variables continuas fueron categorizadas y los análisis de asociación con los SNPs se realizaron siguiendo distintos modelos de herencia genética: codominante, dominante y recesivo.

Los test chi-cuadrado y Fisher fueron usados para evaluar la homogeneidad en la distribución de los genotipos entre los distintos grupos. La asociación entre las variables clínicas y los SNPs fueron analizadas mediante regresión logística binaria ajustada a las variables pertinentes en cada caso. Los valores estimados de asociación fueron estimados mediante el *odds ratio* (OR) y el intervalo de confianza al 95%.

El análisis de asociación entre los SNPs y el intervalo de supervivencia libre de recurrencia bioquímica tras el inicio del tratamiento fue estimado usando el análisis de

Kaplan–Meier y el test log-rank para la significación del mismo. El análisis de regresión de Cox fue usado para asegurar la asociación previa de las variantes genéticas y la supervivencia libre de recurrencia bioquímica ajustando por el nivel del PSA en el momento del diagnóstico, la puntuación de Gleason, el estadio T y la edad.

En todos los análisis realizados el nivel de significación establecido fue de un p valor ≤ 0.05 .

El análisis del equilibrio de Hardy–Weinberg , se realizó usando el software SNPstats ¹⁰⁹ (<https://www.snpstats.net/snpstats/>). Mientras, para el análisis de desequilibrio de ligamiento y de asociación de haplotipos se emplearon los programas SNPstats y Haploview v.4.2 ¹¹⁰.

Equilibrio de Hardy–Weinberg:

Es un principio de genética de poblaciones que establece que en ausencia de factores perturbadores las frecuencias genotípicas y alélicas en una población permanecerán constante de una generación a otra. Según este principio, las frecuencias genotípicas y alélicas permanecerán constantes en una población con apareamiento aleatorio y sin circunstancias disruptivas. El principio se basa en la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2p(1-p) + (1-p)^2 = 1$$

Donde p es la frecuencia del alelo “A” y $1-p$ la frecuencia del alelo “a” en la población. p^2 representa la frecuencia de homocigotos AA, $(1-p)^2$ la frecuencia de homocigotos aa y $2p(1-p)$ la frecuencia de heterocigotos Aa en la población (Tabla 8). La suma de las frecuencias alélicas de los alelos debe sumar 1.

Tabla 8. Cuadro de Punnett para inferir las frecuencias genotípicas de las frecuencias fenotípicas bajo la suposición del principio de Hardy–Weinberg.

	A (p)	a ($1-p$)
A (p)	AA (p^2)	Aa [$p(1-p)$]
a ($1-p$)	Aa [$p(1-p)$]	aa [$(1-p)^2$]

Esta ecuación sirve para comprobar si las frecuencias genotípicas observadas en la población difieren de las frecuencias predichas por la ecuación ¹¹¹ e incluye un test de chi-cuadrado.

Un p-valor < 0.05 significa que existen diferencias entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas en la población y por lo tanto la población no se encuentra en equilibrio de Hardy–Weinberg (HWE).

Desequilibrio de ligamiento:

El término desequilibrio de ligamiento (LD) hace referencia a la asociación no aleatoria de alelos en loci próximos. Los alelos en loci adyacentes tendrán una mayor probabilidad de segregarse juntos durante la meiosis por la escasa recombinación entre ellos. Los alelos en LD forman un bloque o haplotipo. Para calcularlo se compara la frecuencia observada de un haplotipo con la frecuencia esperada. Las dos medidas más comunes para estimar el LD son los valores absolutos de D' y r².

$$D = p_{AB} - p_A p_B$$

A y B son dos loci con dos alelos cada uno (Aa y Bb) en locus distintos. La frecuencia del haplotipo AB observada viene representada por p_{AB}. Asumiendo la independencia de los dos loci, la frecuencia esperada del haplotipo es calculada como el producto de la frecuencia alélica de los dos alelos (p_A · p_B), donde p_A es la frecuencia del alelo A en el primer locus y p_B la frecuencia del alelo B en el segundo locus. El valor de D' se obtiene dividiendo D por su valor máximo posible según las frecuencias de los alelos en los dos loci ¹¹².

D' igual a 1 significa un LD completo pero su valor depende mucho del tamaño de la muestra. r² es similar a D', y se considera que un r² igual a 1 es un LD perfecto.

$$r^2 = \frac{D^2}{p_A(1 - p_A)p_B(1 - p_B)}$$

Los SNPs se consideran en desequilibrio de ligamiento cuando mostraron un valor de r² > 0.8.

Los haplotipos generados se analizaron en relación a la presencia tumoral y a las variables clínicas de los pacientes con PCa mediante regresión logística con el software SNPstats.

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs

4.1. Extracción de ARN

El primer paso para analizar el perfil de expresión de miRNAs de los pacientes es la extracción de ARN a partir del tejido prostático obtenido mediante biopsia.

Para la extracción de ARN se usó Trizol[®]/cloroformo. Para conocer en detalle el método de extracción de ARN ir al anexo II.

El ARN extraído a partir de las distintas muestras, fue cuantificado con el NanoDrop[™] 2000c para medir su concentración y pureza. En este caso una relación A260/A280 en torno a 2.0 es aceptado para el ARN puro.

4.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Es la técnica más sensible para la identificación y cuantificación de los niveles de miRNAs que contiene una muestra.

En primer lugar el ARN es transcrito a ADN complementario (ADNc) por la enzima retrotranscriptasa. Entonces la cadena de ADNc monocatenario es usada como molde para la reacción de qPCR.

El análisis de la expresión de miRNAs se llevó a cabo mediante sondas TaqMan[™] (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Y durante todo el proceso de trabajo tanto los reactivos como los productos deben permanecer siempre en hielo para evitar su degradación.

4.2.1. Retrotranscripción

Para llevar a cabo la retrotranscripción de los miRNAs se utilizaron dos kits diferentes: el kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription* para ARN pequeño nucleolar RNU6B y el kit *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis* para los miRNAs miR-141, miR-375 y miR-130b (ambos de Applied Biosystem, Foster City, CA).

El kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription* está diseñado para trabajar con primers específicos para cada miRNA que son proporcionados junto con las sondas *TaqMan™*.

Por su parte, el kit *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis* está diseñado para trabajar con primers universales lo que permite partiendo de una sola muestra de ARN, obtener una molécula de ADNc con múltiples dianas de miRNA. Para ello a partir de la muestra de ARN total modifica el miRNA maduro por la adición de colas de poliadelinación (poli-A) al extremo 3' y la ligación de un adaptador en el extremo 5' para su elongación. Las secuencias presentes en ambos extremos ampliados de los miRNA maduros son reconocidas por los primers universales del kit para su conversión en ADNc.

Por último, para la obtención de ADNc del gen GAPDH se utilizó el kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Qiagen, Hilden, Alemania).

Todas las reacciones de termociclación se realizaron en el *Veriti™ Thermal Cycler* empleando los reactivos y condiciones de termociclación recomendados en cada caso.

Una vez concluidas todas las reacciones de retrotranscripción, el ADNc de cada una de las muestras fue almacenado a -20°C hasta su uso.

4.2.1. Amplificación por qPCR

Es el segundo paso de RT-qPCR, en el que la ADN polimerasa utiliza el ADNc como molde para amplificar las secuencias diana de los miRNAs, usando primers y sondas *TaqMan™* específicos.

Para llevar a cabo la reacción son necesarios los siguientes reactivos:

- ADNc previamente diluido.
- *2X TaqMan[®] Universal PCR Master Mix*. Contiene *AmpliTaq Gold[®] DNA Polimerasa*, *dNTPs* con *dUTP*, *ROX[™] Passive Reference* (para normalizar diferencias entre pocillos debidas a artefactos), *AmpErase[®] UNG* (enzima que elimina productos de amplificación previos en los que se haya incorporado el uracilo) y Buffers.
- *20X TaqMan[®] miRNA Assay* o *20X TaqMan[®] Advanced miRNA Assay* (específico para cada miARN). Contienen dos primers (forward y reverse) con la secuencia para la región de interés a amplificar y la sonda TaqMan[®] marcada cada con el fluorocromo.

Para los ensayos de expresión de GAPDH se emplearon primers prediseñados KiCqStart[®] SYBR[®] Green (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencia de los primers prediseñados empleados para el análisis de expresión de GAPDH.

Primer Forward	Primer Reverse
ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA	CATGGTTCACCCCATGACGAACA

Para llevar a cabo la reacción son necesarios los siguientes reactivos:

- ADNc previamente diluido.
- *iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Supermix*. Contiene *iTaq DNA polimerasa*, *dNTPs*, *MgCl₂*, *SYBR[®] Green I dye*, potenciadores, estabilizadores y una mezcla de colorantes pasivos de referencia (incluidos ROX y fluoresceína).
- Primers forward y reverse.
- H₂O libre de DNAsas.

En todos los análisis se realizaron tres réplicas por condición para determinar las variaciones y optimizar su precisión. Además se incluyó un control negativo (NTC) que

incluye la master mix y la sonda pero carece de ADNc, para corroborar que la amplificación de las muestras no se debía a la contaminación de alguno de los componentes.

La reacción de amplificación se realizó en el sistema de *7900HT Fast Real-Time PCR* que recoge las curvas de amplificación a tiempo real. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 50°C durante 2 minutos (1 ciclo); 95°C durante 10 minutos (40 ciclos); 95°C durante 15 segundos (1 ciclo); 60°C durante 1 minuto (1ciclo) y mantenimiento a 4°C.

Los resultados de las curvas de amplificación fueron recogidos en el *Standard Curve (AQ) Plate Document* (Figura 24).

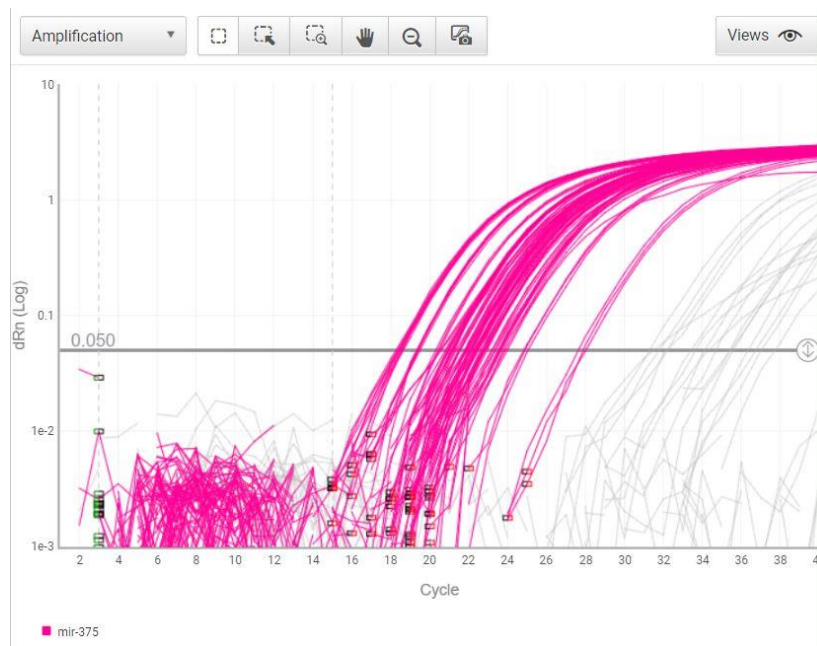


Figura 24. Curvas de amplificación recogidas en el *Standard Curve (AQ) Plate Document*.

En un ensayo de PCR a tiempo real se detecta una reacción positiva de amplificación mediante la acumulación de una señal fluorescente. El ciclo umbral (Ct) se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente alcance un umbral definido. Los valores de CT son inversamente proporcionales a la abundancia de miRNA/ARNm diana y se utilizan para estimar el nivel de expresión.

4.3. Identificación del control endógeno adecuado

El miRNA miR-130b, el ARN pequeño nucleolar RNU6B y el gen GAPDH fueron elegidos como potenciales de genes referencia y evaluados con el objetivo de seleccionar el más estable para normalizar la expresión de los miRNAs de estudio.

Para cada uno de ellos la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) de los ciclos cuantificados fueron calculados.

Además se usaron las herramientas de análisis *NormFinder*¹¹³ (<https://moma.dk/normfinder-software>) y *BestKeeper*¹¹⁴ (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) para asegurar la estabilidad de los controles endógenos candidatos.

NormFinder usa valores de expresión de escala lineal y devuelve el valor de estabilidad y el error estándar para cada gen control endógeno.

BestKeeper usa valores de Ct para identificar el control endógeno más estable basado en la comparación por pares entre genes. Determina la desviación estándar y el coeficiente de variación.

4.4. Tratamiento estadístico de los resultados

El paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Inc, Armonk, NY) y el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) fueron igualmente usados para el análisis estadístico y la presentación de los resultados. Un $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Las variables clínicas fueron categorizadas.

4.4.1. Normalización de los valores de expresión.

Los niveles de expresión de cada miRNA fueron originalmente presentados como valores Ct. Los valores de Ct no determinados en el Ct =35 se consideraron indeterminados. Para el análisis de los datos, los valores Ct de cada muestra fueron normalizados (ΔCt) restando el valor de Ct de un control endógeno a cada miRNA de estudio, es decir, $\Delta Ct = Ct \text{ miRNA de interés} - Ct \text{ control endógeno}$.

4.4.2. Análisis de asociación con las variables clínicas y supervivencia de los pacientes

La expresión relativa de los miRNAs fue estimada como el valor relativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. El test de Kolmogorov–Smirnov se usó para analizar la distribución normal de los datos. Para determinar las diferencias significativas entre los niveles de expresión de los miRNAs de interés y las variables clínicas se aplicó el test no paramétrico U de Mann Whitney.

El tiempo libre de recurrencia bioquímica en los pacientes tras el inicio del tratamiento se determinó mediante análisis de Kaplan–Meier. Para evaluar el valor pronóstico de los miRNAs se comparó a los pacientes una expresión superior a la media frente a los pacientes con una expresión inferior a la media, establecida para cada uno de los tratamientos.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE SNPS CON LA PRESENCIA TUMORAL Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

1.1. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG (HWE)

La población total de estudio, así como la cohorte de sujetos controles y la de pacientes con PCa estuvieron en HWE para los SNPs pertenecientes a los genes CYP17A1, ER1, ER2 y LHCGR (Tabla 10). Para las variantes rs6152 y rs9332969, ambas pertenecientes al gen AR, no se realizó el análisis de HWE ya que éste gen se encuentra en el cromosoma X. Para variantes del cromosoma X, el análisis de HWE solamente se aplica a mujeres, ya que los hombres son hemicigóticos (tienen una sola copia del gen heredada de la madre) y se les consideran poco informativo ¹¹⁵.

Tabla 10. Resumen del análisis de equilibrio de HWE

SNPs		Genotipos			Alelos		p-valor
		<u>AA</u>	<u>AG</u>	<u>GG</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	
rs743572 (CYP17A1)	Población Total	120	148	43	388	234	0.9
	Controles	53	82	20	188	122	0.24
	PCa	67	66	23	200	112	0.3
rs6162 (CYP17A1)	Población Total	42	160	109	244	378	0.19
	Controles	21	84	50	126	184	0.18
	PCa	21	76	59	118	194	0.73
rs6163 (CYP17A1)	Población Total	41	152	118	234	388	0.55
	Controles	19	81	55	119	191	0.24
	PCa	22	71	63	115	197	0.86
rs1004467 (CYP17A1)	Población Total	241	67	3	549	73	0.78
	Controles	114	39	2	267	43	0.74
	PCa	127	28	1	282	30	1
rs2293275 (LHCGR)	Población Total	126	151	34	403	219	0.32
	Controles	63	73	19	199	111	0.86
	PCa	63	78	15	204	108	0.22

SNPs		Genotipos			Alelos		p-valor
		<u>AA</u>	<u>AT</u>	<u>TT</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	
rs1062577 (ESR1)	Población Total	6	72	233	538	84	0.81
	Controles	4	36	115	266	44	0.51
	PCa	2	36	118	278	40	1
rs1256049 (ESR2)	Población Total	280	31	0	591	31	1
	Controles	141	14	0	296	14	1
	PCa	139	17	0	295	17	1

1.2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El estudio de desequilibrio de ligamiento (LD) se realizó únicamente para las variantes del gen CYP17A1. El coeficiente D' mostró que los SNPs rs743572, rs6162 rs6163 y rs1004467 se encuentran linkados o ligados entre sí formando parte de un mismo bloque, en la población de estudio (controles y pacientes). No obstante, según el coeficiente r^2 , solo los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163 ($r^2 > 0.8$). Ver Tabla 11 y Figura 25

Tabla 11. Coeficientes D' y r^2 para los SNPs del gen CYP17A1 obtenidos mediante el programa SNPStats.

	rs743572	rs6162	rs6163	rs1004467	
rs743572	—	D'=0.9575 $r^2=0.9321$	D'=0.9859 $r^2=0.9661$	D'=0.9456 $r^2=0.4711$	Controles
		D'=0.9557 $r^2=0.917$	D'=0.9713 $r^2=0.9513$	D'=0.9327 $r^2=0.4063$	Pacientes
rs6162	—	—	D'=0.9854 $r^2=0.94$	D'=0.9425 $r^2=0.4571$	Controles
			D'=0.9427 $r^2=0.9235$	D'=0.9988 $r^2=0.4177$	Pacientes
rs6163	—	—	—	D'=0.9993 $r^2=0.5081$	Controles
				D'=0.9988 $r^2=0.4264$	Pacientes
rs1004467	—	—	—	—	—

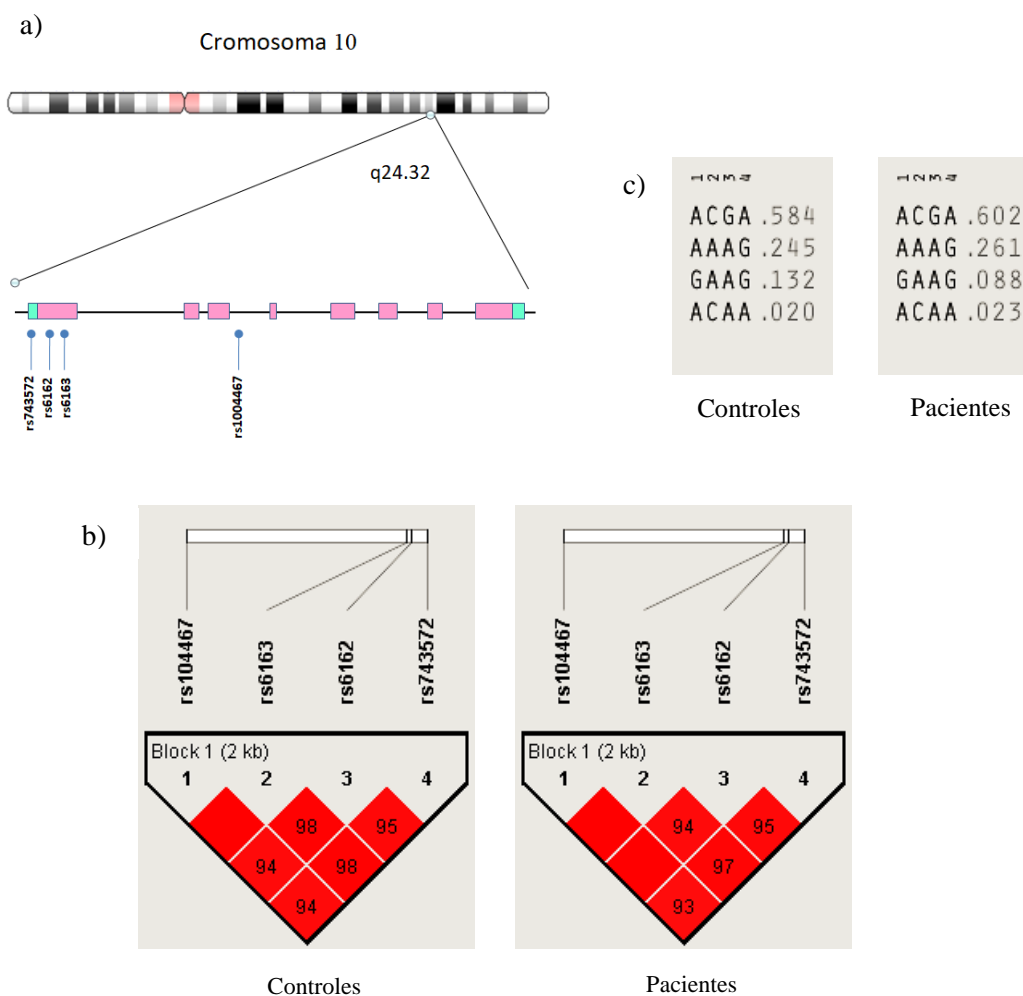


Figura 25. Mapa genético (a), LD (coeficiente D') (b) y haplotipos de los SNPs del gen CYP17A1 obtenido mediante el software Haploview.

1.3. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La cohorte incluyó un total de 311 individuos caucásicos sospechosos de PCa, de los cuales 156 fueron pacientes con PCa y 155 fueron controles.

La tabla 12 muestra las características de la cohorte completa. La media de edad los pacientes diagnosticados con PCa fue ligeramente superior a la de la población control (69.42 ± 8.78 años y 67.30 ± 8.15 años, respectivamente (valor medio \pm desviación estándar)), pero ambas edades se encuentran dentro del rango de edad en el que se produce un mayor incremento en el riesgo de padecer PCa (65-74 años). Entre los 155 controles, 106 (68.4%) tuvieron un valor de PSA en el diagnóstico > 4 ng/ml y ≤ 10

RESULTADOS

ng/ml, 47 (30.3 %) un valor > 10 ng/ml y ≤ 20 ng/ml y tan solo 2 individuos (1.3%) tuvieron un valor > 20 ng/ml en el diagnóstico. Entre los 156 pacientes, 84 (53.8%) tuvieron un valor de PSA en el diagnóstico > 4 ng/ml y ≤ 10 ng/ml; 33 (21.2%) tuvieron un valor > 10 ng/ml y ≤ 20 ng/ml y 39 pacientes (25%) tuvo un valor > 20 ng/ml en el diagnóstico. Hubo claras diferencias significativas entre el valor de PSA en el diagnóstico entre controles pacientes con PSA ($p = 0.00$).

Las biopsias de todos los pacientes con PCa ofrecieron información acerca de la puntuación de Gleason. 132 pacientes (84.6%) tuvieron una puntuación de Gleason ≤ 7 y 24 pacientes (15.4%) tuvieron una puntuación de Gleason > 7 . Hubo 147 pacientes con información para el estadio T (9 pérdidas), de los cuales 137 pacientes (93.2%) presentaron en el diagnóstico una enfermedad en estadio T1 o T2 (tumores localizados) y sólo 10 pacientes (6.8%) presentaron una enfermedad en estadio T3 o T4 (tumores localmente avanzados y avanzados).

Con la información clínica anterior, 153 pacientes (3 pérdidas) pudieron ser clasificados siguiendo el sistema D'Amico, de los cuales 54 pacientes (35.3%) fueron asignados al grupo de bajo riesgo, 54 (35.3%) al grupo de riesgo medio y 45 pacientes (29.4%) se incluyeron en el grupo de alto riesgo.

Tabla 12. Resumen de las variables clínicas de los pacientes con PCa y los controles incluidos en el estudio.

	Pacientes n=156	Controles n=155
Edad Media	69.42	67.30
Rango	48-88	49-85
PSA inicial (ng/ml)		
> 4 \leq 10	84 (53.8%)	106 (68.4%)
> 10 \leq 20	33 (21.2%)	47 (30.3%)
> 20	39 (25%)	2 (1.3%)
Puntuación de Gleason		
≤ 7	132(84.6%)	n.a.
>7	24 (15.4%)	n.a.
Estadio T		
T1-T2	137 (93.2%)	n.a.
T3-T4	10 (6.8%)	n.a.
Perdidos	9	
Riesgo D'Amico		
Bajo	54 (35.3%)	n.a.
Medio	54 (35.3%)	n.a.

	Pacientes n=156	Controles n=155
Alto	45 (29.4%)	n.a.
Perdidos	3	
Periodo de Seguimiento (meses)		
Media (Rango)	34.18 (1-54)	n.a.
Perdidos	8	

Pie de Tabla 12: n.a (no aplicable)

1.4. ESTUDIO CASO-CONTROL

Los 9 SNPs seleccionados para el estudio fueron satisfactoriamente genotipados en el total de la población. En el caso del rs9332969 (AR) el 100% de los individuos fueron hemocigotos para el alelo G por lo cual esta variante fue descartada para posteriores análisis estadísticos por su falta de diversidad genética.

Además para el rs1256049 (ESR2) no hubo individuos homocigotos para el alelo T (TT). Estos resultados están en consonancia con los resultados de la fase III del *1000 Genomes Project* ya que muestra que no existen individuos TT entre la población europea (Emsembl).

En primer lugar, analizamos la relación de los SNPs con el riesgo de desarrollo de PCa. Sin embargo, ninguna de las variantes estudiadas mostró diferencias significativas entre los pacientes y los controles. La tabla 13 resume los genotipos de los pacientes y los controles para cada polimorfismo (los modelos dominante y recesivo no se muestran).

Tabla 13. Resumen de los genotipos en la cohorte incluida en el estudio.

SNPs		Frecuencias genotípicas			p-valor
		<u>A</u>		<u>G</u>	
rs6152 (AR)	Controles	25 (16.1%)	-	130 (83.9%)	0.567
	PCa	29 (18.6%)	-	127 (81.4%)	
rs9332969 (AR)	Controles	0	-	156 (100%)	n.a
	PCa	0	-	155 (100%)	
rs743572 (CYP17A1)	Controles	<u>AA</u> 53 (34.2%)	<u>AG</u> 82 (52.9%)	<u>GG</u> 20 (12.9%)	0.168
	PCa	67 (42.9%)	66 (42.3%)	23 (14.7%)	
		<u>AA</u>	<u>AG</u>	<u>GG</u>	

SNPs		Frecuencias genotípicas			p-valor
rs6162 (CYP17A1)	Controles	21 (13.5%)	84 (54.2%)	50 (32.3%)	0.566
	PCa	21 (13.5%)	76 (48.7%)	59 (37.8%)	
rs6163 (CYP17A1)	Controles	AA 19 (12.3%)	AC 81 (52.3%)	CC 55 (35.5%)	0.492
	PCa	22 (14.1%)	71 (45.5%)	63 (40.4%)	
rs1004467 (CYP17A1)	Controles	AA 114 (73.5%)	AG 39 (25.2%)	GG 2 (1.3%)	0.242
	PCa	127 (81.4%)	28 (17.9%)	1 (0.6%)	
rs2293275 (LHCGR)	Controles	CC 63 (40.6%)	CT 73 (47.1%)	TT 19 (12.3%)	0.729
	PCa	63 (40.4%)	78 (50.0%)	15 (9.6%)	
rs1062577 (ESR1)	Controles	AA 4 (2.6 %)	AT 36 (23.2%)	TT 115 (74.2%)	0.704
	PCa	2 (3.0%)	36 (23.1%)	118 (75.6%)	
rs1256049 (ESR2)	Controles	CC 141 (91.0%)	CT 14 (9.0%)	TT -	0.583
	PCa	139 (89.1%)	17 (10.9%)	-	

Pie de Tabla 13: n.a (no aplicable)

Además, al analizar si las diferencias en los valores de PSA entre los pacientes y los controles podían ser explicadas por alguna de las variantes de estudio, no se hallaron asociaciones estadísticamente significativas para ninguno de los SNPs (resultados no mostrados).

1.5. ESTUDIO CASO-CASO

1.5.1. Estudio de asociación con las variables clínicas de los pacientes

Tras el estudio de asociación de la enfermedad con cada uno de los SNPs se llevó a cabo la estratificación de los pacientes en base a las variables clínicas.

Al centrarnos solo en la cohorte de pacientes con PCa se halló una relación estadísticamente significativa entre los valores de PSA y los SNPs rs743572 (p=0.003); rs6162 (p=0.015) y rs6163 (p=0.010), todos ellos pertenecientes al gen CY17A1 (ver Tabla 14 y Figura 26). Además el análisis de regresión logística ajustado por edad demostró que los pacientes homocigotos para G en el rs743572 (p=0.032; OR=3.017, 95% CI (1.102-8.260); los pacientes homocigotos para A en el rs6162 (p=0.036; OR=3.129; 95% CI (1.076-9.103) y los pacientes homocigotos para el alelo A en el rs6163 (p=0.054 ; OR=2.702; 95% CI (0.984-7.417) presentaban un mayor riesgo de

tener valores de PSA superiores a 10 ng/ml frente a los individuos que eran AG y AA para el rs743572, AG y GG para el rs6162 y AC y CC para el rs6163. Ver tabla 15.

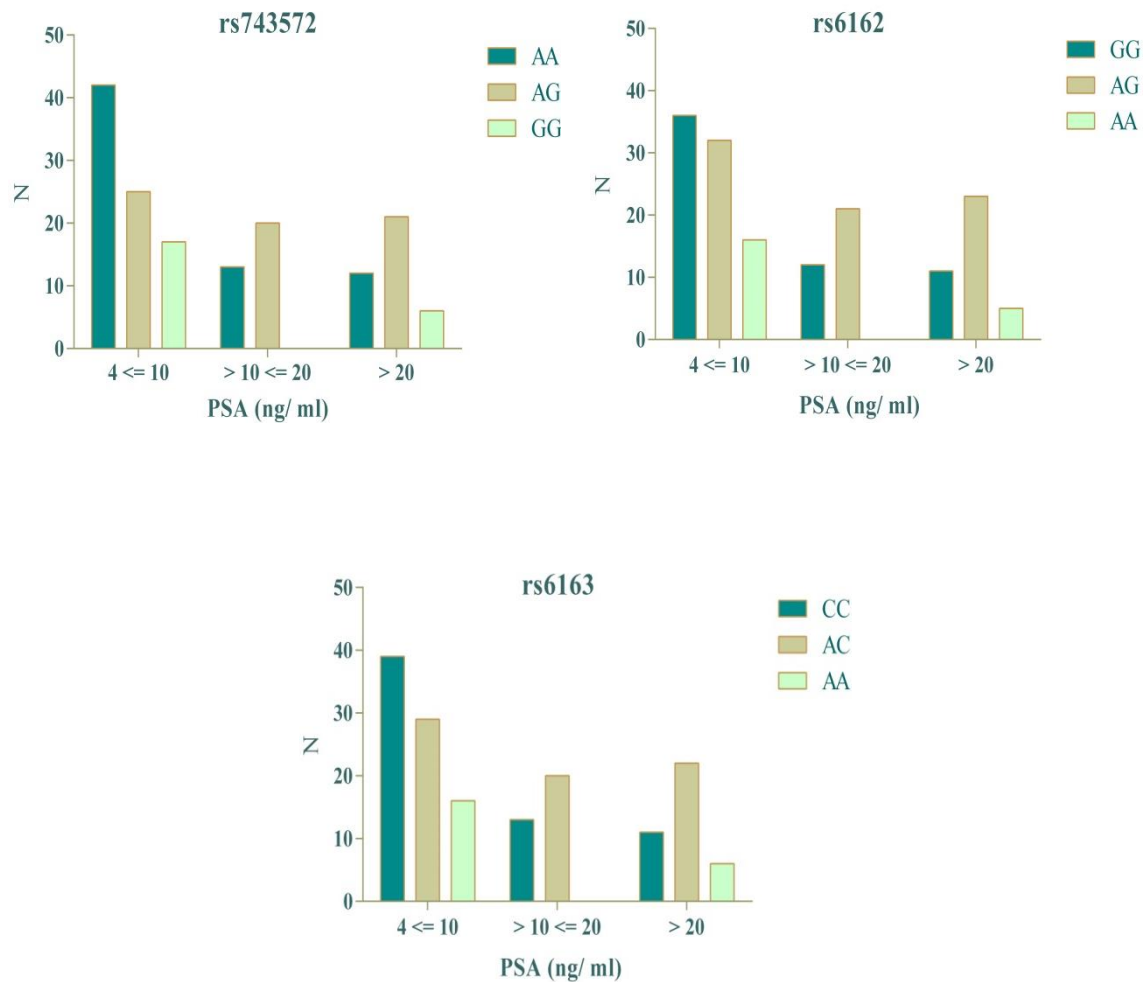


Figura 26. Relación entre los valores de PSA (ng/ml) de los pacientes con PCa y los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163 (CYP17A1)

Con respecto a la puntuación de Gleason, no se encontró ningún SNP que se asociase estadísticamente de forma significativa, aunque el rs1256049 del gen ESR2 estuvo cerca de la significación ($p=0.076$).

Para el estadio T, solo el rs2293275 del gen LHCGR se relacionó significativamente con dicha variable clínica ($p = 0.037$) (Figura 27, Tabla 14). Sin embargo, al analizar la relación mediante regresión logística ajustada a la edad el p-valor se quedó cerca de la significación. (Ver Tabla 15).

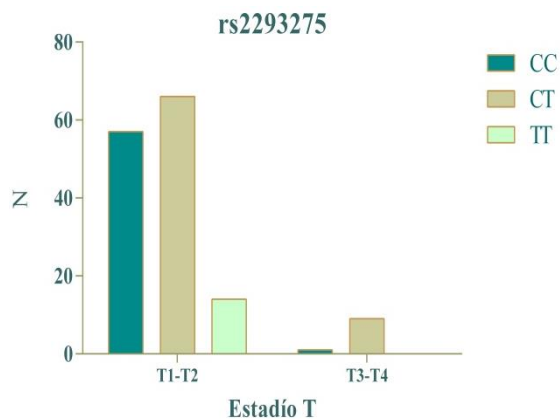
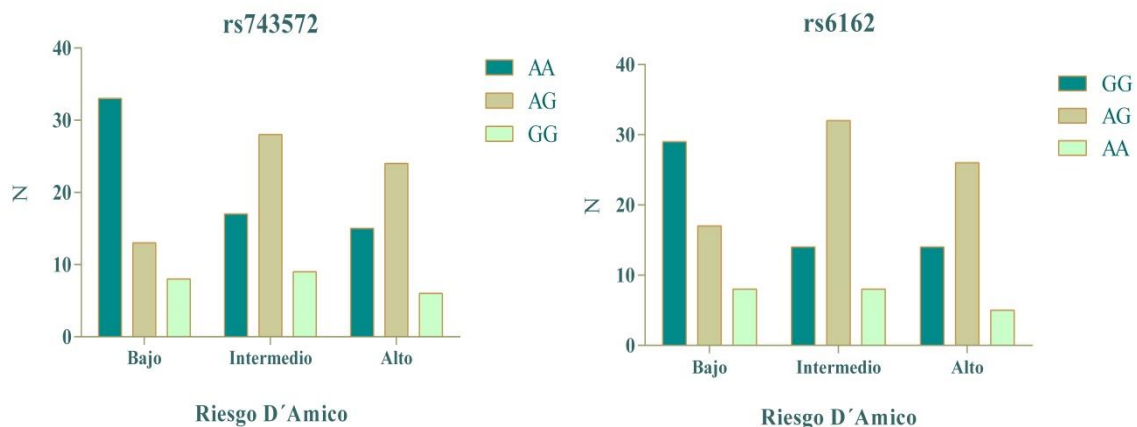


Figura 27. Relación entre el estadio T y el rs2293275 ubicado en el gen LHCGR.

Por último, se halló una asociación estadísticamente significativa entre la clasificación D'Amico y varios SNPs del gen CYP17A1: rs743572 ($p=0.008$), rs6162 ($p=0.019$), rs6163 ($p=0.015$), y rs1256049 ($p=0.029$); ver Figura 28 y Tabla 14. El análisis de regresión logística multivariante ajustado a la edad, PSA, puntuación de Gleason y estadio T, demostró que los pacientes portadores del alelo G en el rs743572 (AG o GG) tenían riesgo significativamente mayor de ser estratificados dentro de los grupos de riesgo medio y alto frente a los pacientes homocigotos para el alelo A (AA) ($p=0.016$; OR=3.856; 95% CI (1.281 -11.603)). De igual forma, la presencia del alelo A (AA o AG) en los pacientes en el rs6162 y la presencia del alelo A (AA o AC) en los pacientes en el rs6163 confería un incremento del riesgo de ser estratificados en los grupos de riesgo medio y alto frente a los pacientes GG ($p=0.032$; OR=3.574; 95% CI (1.117-11.439)) y CC ($p=0.019$; OR=3.866; 95% CI (1.248-11.981)), respectivamente. Sin embargo, la asociación de rs1256049 con el riesgo intermedio y alto no se mantuvo en el modelo multivariante. Esto parece deberse al bajo número de pacientes CT con riesgo alto. Ver Tabla 15.



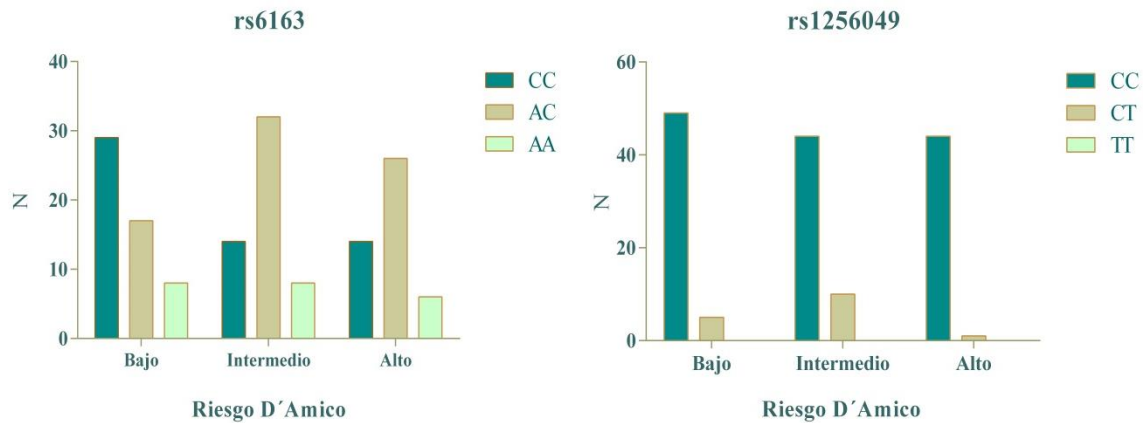


Figura 28. Asociación entre el Riesgo D'Amico y los SNPs rs743572, rs6162, rs6163 (CYP17A1) y rs1256049 (ESR2).

Tabla 14. Resumen de las asociaciones significativas entre las variables clínicas y los SNPs en los pacientes con PCa.

SNPs	Genotipos	Variable Clínica			P-valor ^a
		PSA (ng/ml)			
		> 4 <10	>10 <20	> 20	
rs743572 (CYP17A1)	AA	42	13	12	0.003
	AG	25	20	21	
	GG	17	0	6	
rs6162 (CYP17A1)	AA	16	0	5	0.015
	AG	32	21	23	
	GG	36	12	11	
rs6163 (CYP17A1)	AA	16	0	6	0.010
	AC	29	20	22	
	CC	39	13	11	
Estadio T					
		T1-T2		T3-T4	
rs2293275 (LHCGR)	CC	57		1	0.037
	CT	66		9	
	TT	14		0	
Riesgo D'Amico					
		Bajo	Intermedio	Alto	
rs743572 (CYP17A1)	AA	33	17	15	0.008
	AG	13	28	24	
	GG	8	9	6	
rs6162 (CYP17A1)	AA	8	8	5	0.019
	AG	17	32	26	
	GG	29	14	14	
rs6163 (CYP17A1)	AA	8	8	6	0.015
	AC	15	30	25	
	CC	31	16	14	
rs1256049 (ESR2)	CC	49	44	44	0.029
	CT	5	10	1	
	TT	0	0	0	

^a Test Chi-cuadrado. Solo se muestran los p-valor significativos.

Tabla 15. Análisis multivariante para los SNPs diferencialmente distribuido entre las variables clínicas de los pacientes con PCa.

Variable Clínica	n	SNP	Modelo Dominante			Modelo Recesivo		
				OR (95% CI)	P-valor		OR (95% CI)	P-valor
PSA, 4 < 10 vs. > 10 < 20 vs. > 20	156	rs743572 (CYP17A1)	AA vs. AG+GG	1.871 (0.973-3.597)	0.060	GG vs. AG+AA	3.017 (1.102-8.260)	0.032
		rs6162 (CYP17A1)	GG vs. AG+AA	1.603 (0.825-3.117)	0.164	AA vs. AG+GG	3.129 (1.076-9.103)	0.036
		rs6163 (CYP17A1)	CC vs. AC+AA	1.731 (0.896-3.343)	0.103	AA vs. AC+CC	2.702 (0.984-7.417)	0.054
Estadío T, 1-2 vs. 3-4	147	rs2293275 (LHCGR)	CC vs. CT+TT	7.392 (0.897-60.904)	0.063	TT vs. CT+CC	n.a	n.a
Riesgo D'Amico, bajo vs intermedio + alto	153	rs743572 (CYP17A1)	AA vs. AG+GG	3.856 (1.281 -11.603)	0.016	GG vs. AG+AA	0.298 (0.086 -1.033)	0.056
		rs6162 (CYP17A1)	GG vs. AG+AA	3.574 (1.117-11.439)	0.032	AA vs. AG+GG	2.437 (0.686-8.659)	0.168
		rs6163 (CYP17A1)	CC vs. AC+AA	3.866 (1.248-11.981)	0.019	AA vs. AC+GG	0.367 (0.105-1.290)	0.118
		rs1256049 (ESR2)	CC vs. CT+TT	1.493 (0.352-6.331)	0.586	TT vs. CT+CC	n.a*	n.a*

Pie de Tabla 15: Las variables PSA y estadío T fueron ajustadas por la edad, mientras que la variable riesgo D'Amico fue ajustada por las variables edad, PSA, puntuación de Gleason y estadío T. n.a: no aplicable.

* No hay individuos homocigotos para el alelo T (TT).

1.5.2. Estudio de asociación haplotípica

Al analizar los haplotipos formados por los SNPs del gen CYP17A1 observamos que el haplotipo constituido por el alelo G del rs743572, el alelo A del rs6162, el alelo A rs6163 y el alelo A del rs1004467 se asocia de manera significativa con el riesgo D'Amico (p=0.02; OR=2.07; 95% CI (1.13 -3.79)) (Tabla 16). Con respecto a la presencia tumoral y al resto de variables clínicas (PSA, Gleason y estadío T), no se halló un asociación con ninguno de los haplotipos.

Tabla 16. Asociación haplotípica para los SNPs de CYP17A1 y el riesgo D'Amico.

rs743572 (A>G)	rs6162 (G>A)	rs6163 (C>A)	rs1004467 (A>G)	Frecuencia		OR (95% IC)	P-valor
				B	I-A		
A	G	C	A	0.5453	0.6944	1.00	---
G	A	A	A	0.1944	0.3006	2.07 (1.13-3.79)	0.02
G	A	A	G	0.0741	0.0983	1.66 (0.68-4.08)	0.27
A	A	C	A	0.0185	0.0254	2.11 (0.38-11.67)	0.39

Pie Tabla 16: B (bajo); I-A (intermedio-alto)

1.5.3. Análisis de supervivencia

A 148 pacientes se les hizo un seguimiento del inicio del tratamiento (8 pérdidas). El tiempo medio de seguimiento fue de 34.14 meses, con un rango de 1-54 meses. De ellos 32 (21.6%) recibieron ADT; 73 (49.3%) y 38 pacientes (25.7%) fueron sometidos a radioterapia o prostatectomía radical, respectivamente, y solo 5 pacientes (3.4%) permanecieron en observación o vigilancia activa.

Tras estratificar por el tipo de terapia recibida, la tasa de recurrencia bioquímica fue de 31.3% para los pacientes tratados con ADT, 6.8% para aquellos tratados con radioterapia y 26.3% para los pacientes sometidos a prostatectomía radical. Ninguno de los pacientes que permanecieron en observación o vigilancia activa la manifestaron.

Para aquellos SNPs que mostraron diferencias significativas para el riesgo de D'Amico en el modelo de regresión logística se realizaron análisis de Kaplan-Meier y el test de log-rank para determinar el tiempo libre de recurrencia bioquímica y regresión de Cox.

Se realizaron análisis de Kaplan-Meier y log-rank así como regresión de Cox multivariable para los tratamientos ADT, radioterapia y prostatectomía radical con los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163 ya que éstos mostraron diferencias significativas para el riesgo D'Amico en el modelo de regresión logística. Para ADT y radioterapia ningún SNP se relacionó significativamente con el tiempo libre de recurrencia bioquímica. Sin embargo para la prostatectomía radical, el test log-rank mostró que los genotipos AG y GG para el rs743572 se asociaron casi significativamente con menor tiempo libre de recurrencia respecto al genotipo AA ($p = 0.079$) y que los genotipos AC y AA para el rs6163 se asociaron significativamente con un menor tiempo libre de recurrencia bioquímica comparado con el genotipo CC ($p = 0.039$). Los pacientes AC y AA tuvieron una media de 29.10 meses de supervivencia libre de recurrencia bioquímica frente a los 49.59 meses de media que tuvieron los pacientes CC (Figura 29).

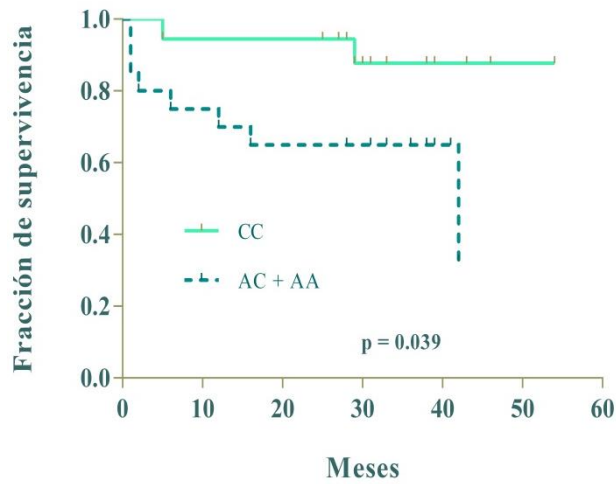


Figura 29. Curva de Kaplan Meier. Representa los diferentes tiempos libres de recurrencia bioquímica entre aquellos pacientes sometidos a prostatectomía radical para el rs6163 (CY17A1).

Sin embargo, no constituyó una variable independiente de mal pronóstico tras el análisis de Cox multivariante ajustado por las diferentes variables clínicas ($p=0.221$; $OR=2.822$; 95% CI (0.535-14.885)).

2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

2. 1. IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL ENDÓGENO ADECUADO

Basándonos en la literatura, miR-130b¹⁰⁷, el gen del ARN pequeño nucleolar RNU6B y el gen GAPDH¹¹⁶ fueron elegidos como potenciales de genes referencia.

Para evaluar la estabilidad de los genes candidatos se analizó su expresión en 50 pacientes (elegidos al azar) mediante RT-qPCR. A los pacientes sin expresión se les asignó un Ct = 35 en lugar de eliminarlos para reflejar mejor la variación de expresión.

El gen GAPDH es el candidato que tuvo mayor expresión (Ct = 27.057) pero también el que mayor variabilidad exhibió. Por su parte el gen RNU6B mostró una menor expresión (Ct = 29.446) pero fue el gen más estable. Por último, el miR-130b tuvo una variabilidad intermedia pero fue el que menor expresión mostró (Ct = 31.876); de hecho no se expresó en 17 de los 50 pacientes en los que se evaluó (Figura 30 y Tabla 17).

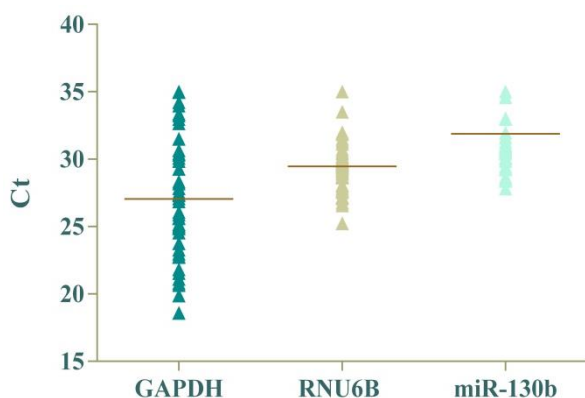


Figura 30. Niveles expresión de los genes candidatos a control endógeno representados por el número de ciclos de PCR. Altos valores de Ct indican una baja expresión y viceversa.

Tabla 17. Resumen de la expresión de los genes candidatos a control endógeno.

Gen	Ct	DE	CV
GAPDH	27.057	4.211	0.156
RNU6B	29.466	1.751	0.059
miR-130b	31.876	2.597	0.081

Pie de Tabla 17: Ct (ciclo umbral); DE (desviación estándar); CV (coeficiente de variación)

Para validar estos resultados, la expresión de los tres candidatos fue analizada con los algoritmos de *NormFinder* y *BestKeeper*.

Tabla 18. Clasificación de los genes candidatos de acuerdo a *NormFinder* y *BestKeeper*.

Gen	<i>NormFinder</i>			<i>BestKeeper</i>	
	Valor de Estabilidad	Error Estándar	Rango	Desviación	Rango
RNU6B	0.734	0.431	1	1.15	1
miR-130b	1.418	0.263	2	1.22	2
GAPDH	2.670	0.286	3	3.29	3

Pie de Tabla 18: El rango fue asignado a cada gen candidato basándose en su estabilidad.

En vista de los resultados obtenidos (Tabla 18) decidimos seleccionar el gen RNU6B como normalizador. Así mismo, descartado el miR-130b como normalizador por su baja expresión y baja estabilidad y dado que ha sido propuesto como miRNA supresor de tumores¹⁰⁸, decidimos evaluar su expresión junto al resto de miRNAs de interés en relación a la agresividad tumoral en pacientes con PCa.

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

El estudio comprendió una cohorte de 131 pacientes. Para todos los pacientes se determinó la expresión de los miRNAs miR-141, miR-375 y miR-130b. Como variables clínicas se incluyó el nivel de PSA al diagnóstico, la puntuación de Gleason, el estadio tumoral y la categoría de riesgo de acuerdo a D'Amico (bajo, intermedio y alto). Las características clínicas de los pacientes se incluyen en la Tabla 19.

Tabla 19. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

	Pacientes (n=131)
Edad Media	69.11
Rango	48-88
PSA inicial (ng/ml)	
> 4 ≤ 10	72 (55.0%)
> 10 ≤ 20	24 (18.3%)
> 20	35 (26.7%)
Puntuación de Gleason	
≤ 7	110 (84%)
>7	21 (16%)
Estadío T	
T1-T2	119 (91.54%)
T3-T4	11 (8.46%)
Perdidos	1
Riesgo D'Amico	
Bajo	46 (35.38%)
Medio	43 (33.08%)
Alto	41 (31.54%)
Perdidos	1
Periodo de Seguimiento (meses)	
Media	32.17
Rango	0-54
Perdidos	8

2.3. IDENTIFICACIÓN DE MIRNAS ASOCIADOS CON VARIABLES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

La media de expresión fue de 32.39 (± 3.20) para el miR-141, de 27.01 (± 4.83) para el miR-375 y de 33.20 (± 2.40) para el miR-130b.

Tras normalizar los datos al nivel de expresión de RNU6B, analizamos la expresión diferencial de los miRNAs miR-141, miR-375 y miR-130b entre los diferentes grupos de riesgo así como entre el resto de parámetros clínico-patológicos.

En base al riesgo, clasificamos a los pacientes en tres grupos: riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto. La comparación de la expresión entre los grupos dos a dos no dio resultados significativos (p -valor > 0.05) (Figura 31).

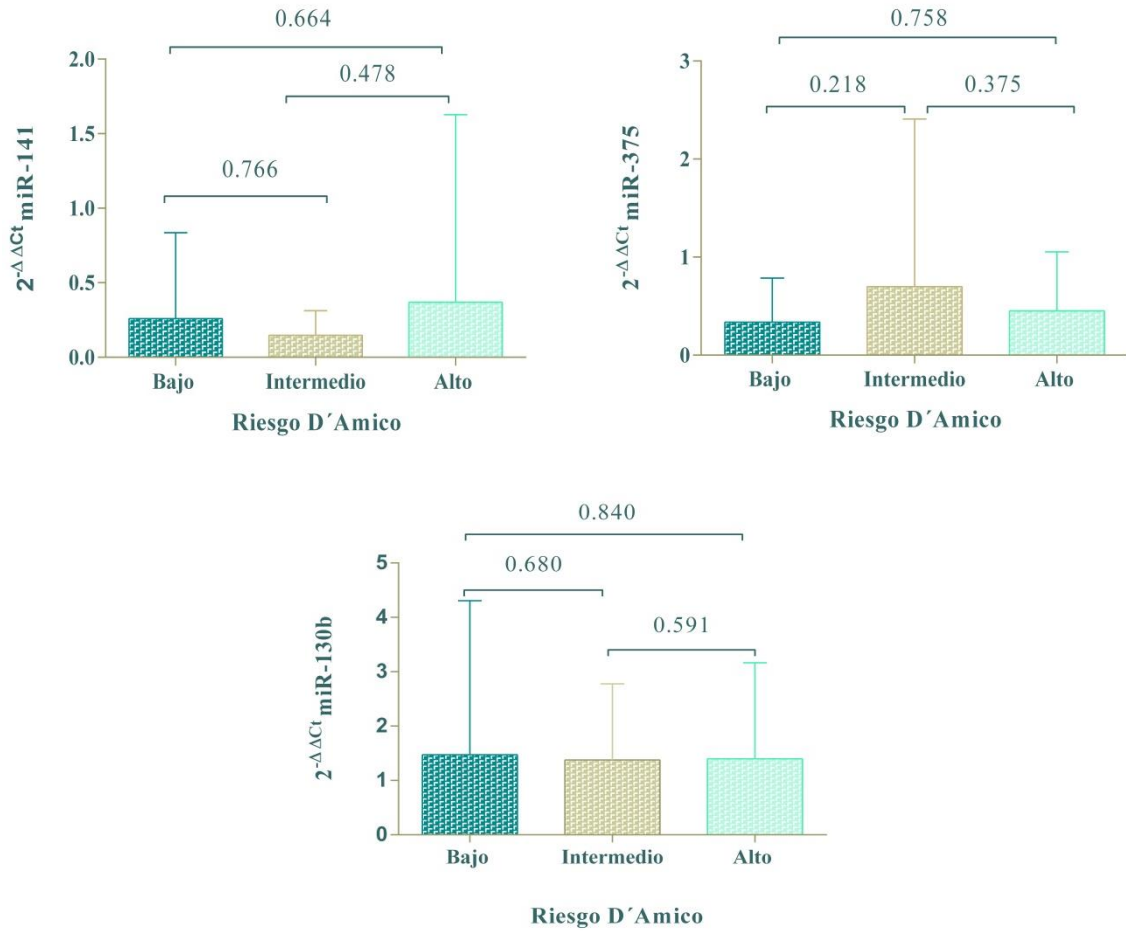


Figura 31. Niveles de expresión de miRNAs en pacientes con bajo, intermedio y alto riesgo.

Para la puntuación de Gleason y el estadio T los pacientes fueron clasificados en dos grupos: Gleason ≤ 7 y Gleason > 7 , T1-T2 y T3-T4, respectivamente. Tras los análisis estadísticos pertinentes, no se evidenció una influencia de la puntuación de Gleason ni del estadio T en la expresión de los miRNAs de estudio en nuestra cohorte. Esto puede ser debido en parte al desequilibrio en el número de pacientes en cada grupo, Gleason ≤ 7 (n=110) vs. Gleason > 7 (n=21) y T1-T2 (n=119) vs. T3-T4 (n=11) (Figura 32).

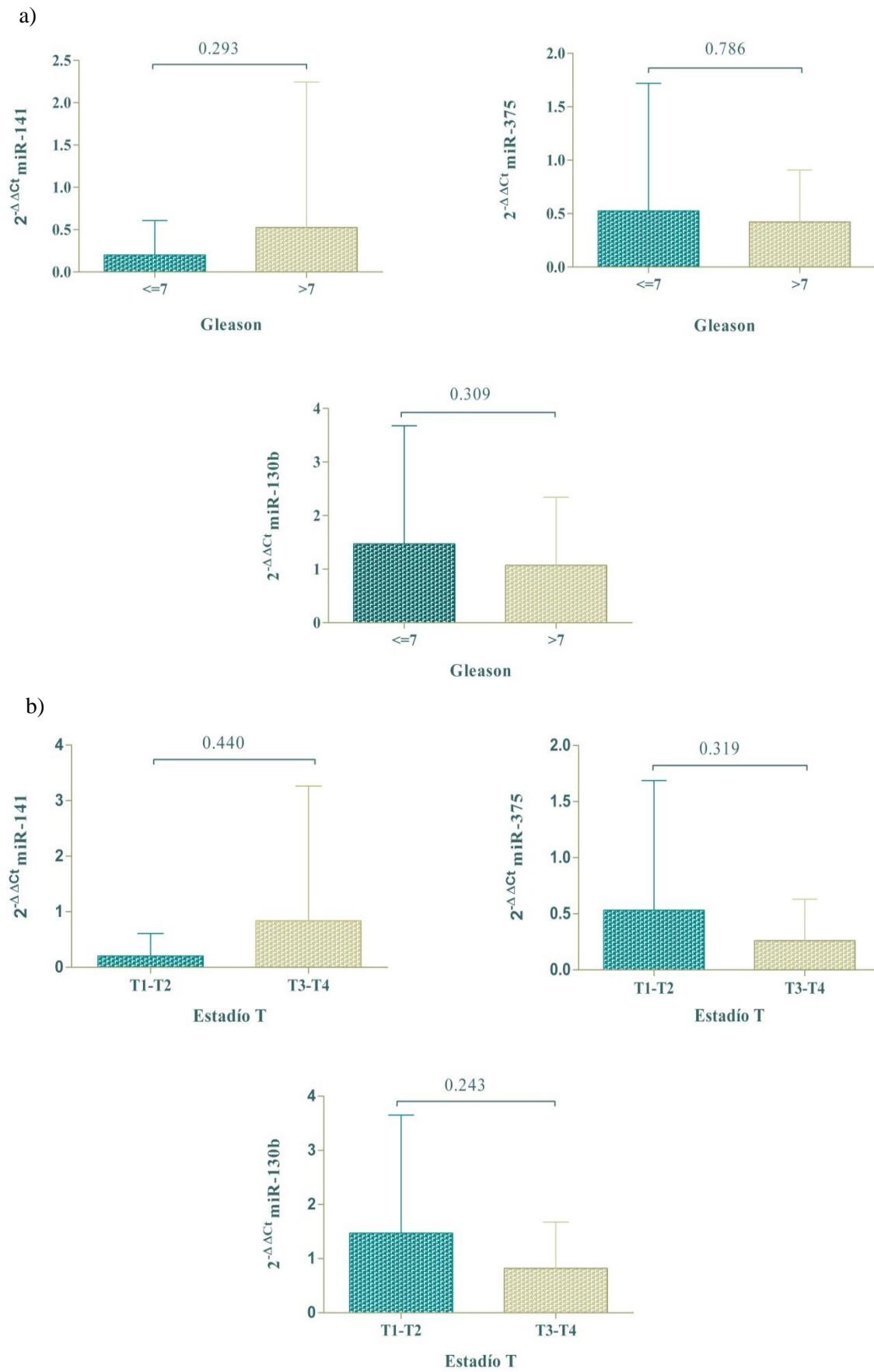


Figura 32. Niveles de expresión de miRNAs a) en pacientes con Gleason ≤ 7 y con Gleason > 7 ; b) en pacientes con estadio T1-T2 y con estadio T3-T4.

RESULTADOS

La expresión de los miRNAs también fue correlacionada con el nivel de PSA al diagnóstico. Para ello categorizamos el nivel de PSA entre grupos: $> 4 \leq 10$ ng/ml, $>10 \leq 20$ ng/ml y > 20 ng/ml. Desafortunadamente no hallamos una desregulación de la expresión de las miRNAs entre los distintos niveles de PSA al comparar entre los grupos. (Figura 33).

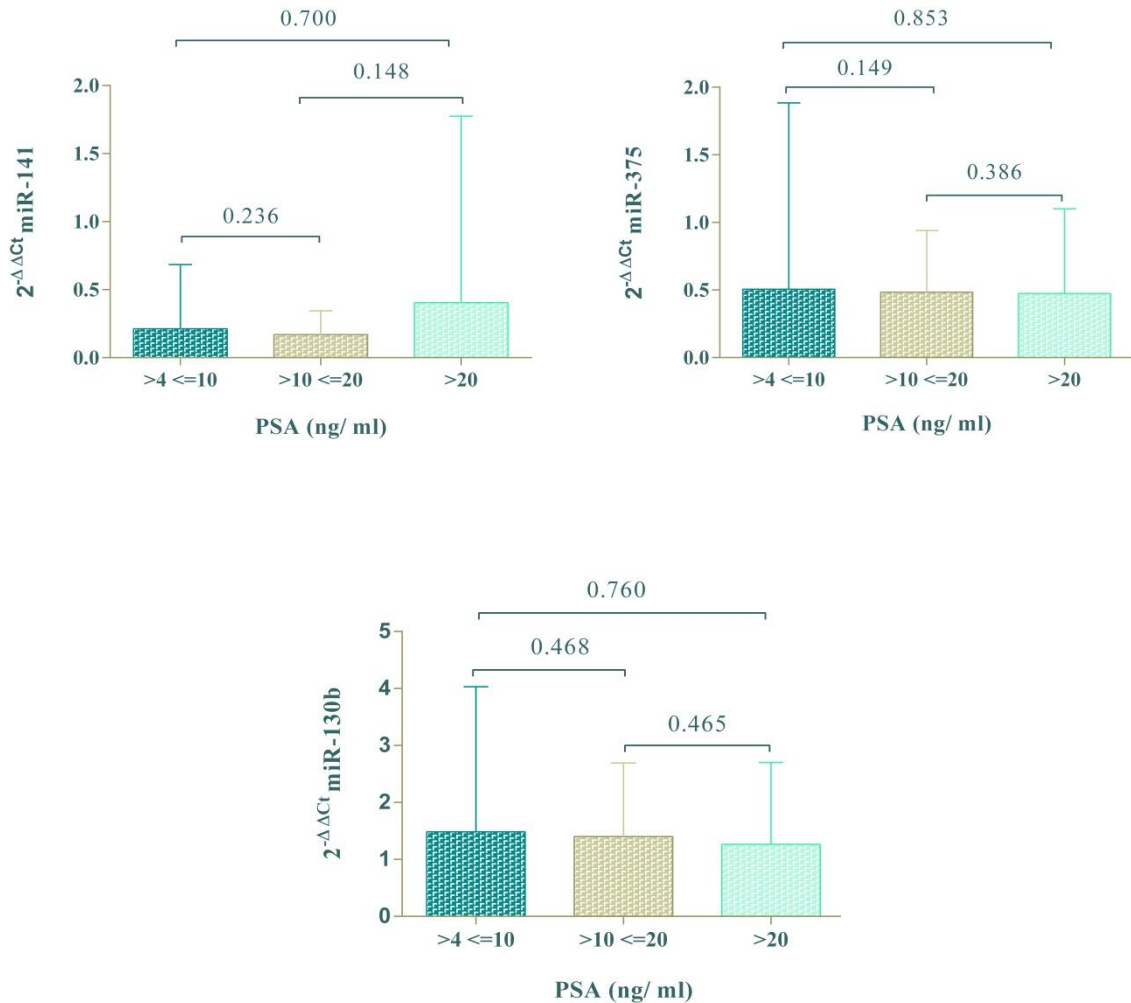


Figura 33. Niveles de expresión de miRNAs en pacientes con PSA $> 4 \leq 10$ ng/ml, $>10 \leq 20$ ng/ml y > 20 ng/ml.

2.4. Análisis de supervivencia

A 123 pacientes de los 131 incluidos en el estudio se les hizo un seguimiento tras el inicio del tratamiento para determinar la aparición de recurrencia bioquímica. En este

caso, el tiempo medio de seguimiento de fue 32.17 meses (rango 0-54 meses). La tasa de progresión bioquímica según el tipo de tratamiento recibido fue de un 29.6% para pacientes con ADT, un 7.7% para pacientes que habían recibido radioterapia y un 28.6% para pacientes sometidos a prostatectomía radical. Ninguno de los pacientes bajo vigilancia activa manifestó una recaída.

Para analizar la correlación entre los niveles de expresión de los miRNAs y el tiempo libre de recurrencia de bioquímica tras el inicio de cada tratamiento, se compararon las curvas de supervivencia de los pacientes con alta y baja expresión para cada miRNA mediante el análisis de Kaplan–Meier y el test estadístico log-rank.

El resultado de dichos análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de recurrencia bioquímica entre los pacientes con alta y baja expresión de los miRNAs para ninguno de los tres tratamientos recibidos: ADT (miR-141: $p=0.323$; miR-375: $p=0.731$; miR-130b: $p=0.878$) radioterapia (miR-141: $p=0.530$; miR-375: $p=0.318$; miR-130b: $p=0.310$) (no se muestran las imágenes) y prostatectomía radical (miR-141: $p=0.890$; miR-375: $p=0.094$; miR-130b= 0.776) (Figura 34).

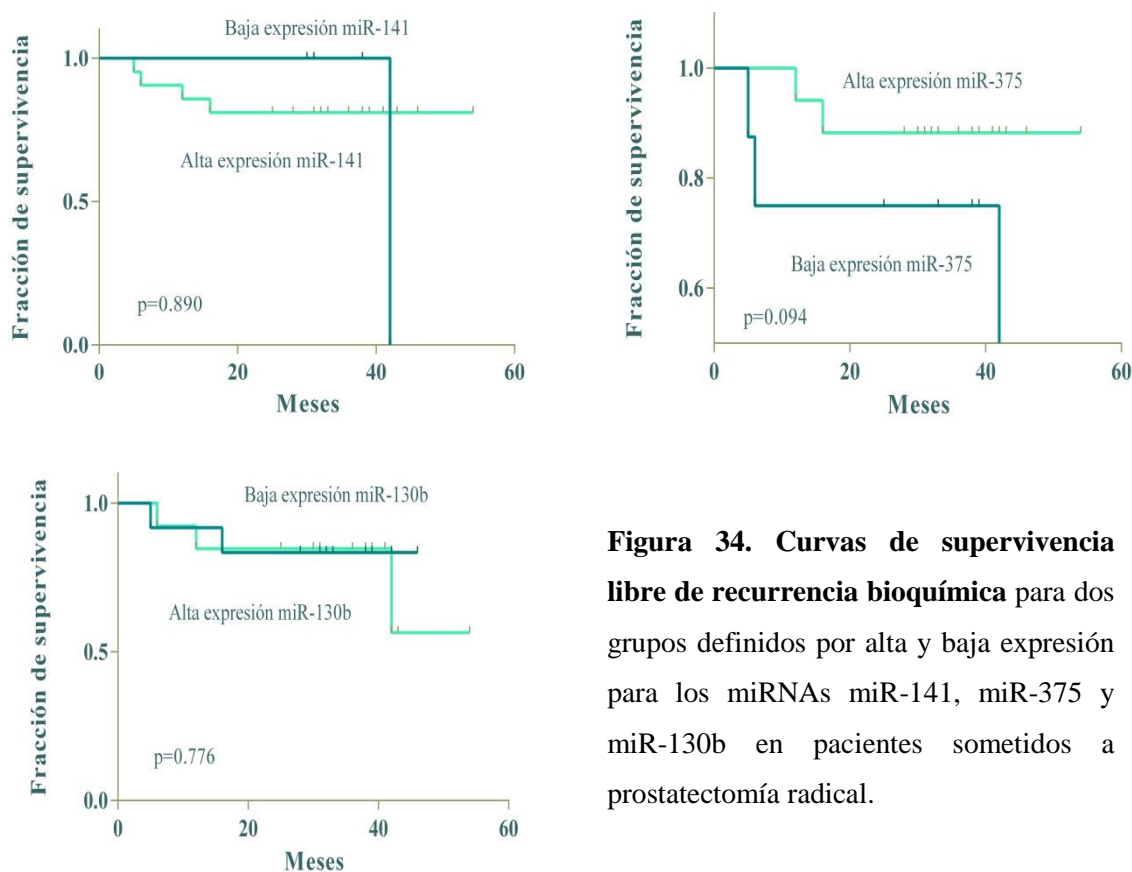


Figura 34. Curvas de supervivencia libre de recurrencia bioquímica para dos grupos definidos por alta y baja expresión para los miRNAs miR-141, miR-375 y miR-130b en pacientes sometidos a prostatectomía radical.

RESULTADOS

Estos resultados pueden deberse parcialmente al reducido número de pacientes de pacientes que recayeron en cada uno de los grupos de tratamiento (8 pacientes en el grupo de ADT, 5 pacientes en el grupo de radioterapia y 8 en el grupo de prostatectomía radical) y al corto tiempo de seguimiento (32.17 meses) de los pacientes.

DISCUSIÓN

1. SOBRE EL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE SNPS CON LA PRESENCIA TUMORAL Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

En este estudio se analiza el papel de 9 SNPs (rs6152, rs9332969, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 y rs1256049) de 5 genes (AR, CYP17A1, LHCGR, ESR1 y ESR2) que participan en la síntesis y metabolismo de andrógenos y estrógenos en una población de individuos españoles con un nivel de PSA ≥ 4 ng/ml sospechosos de tener PCa.

Es estudio se ha enfocado en dos fases: i) con el total de la población se ha llevado a cabo un estudio caso-control; ii) con aquellos individuos con biopsia positiva para PCa se ha realizado un estudio caso-caso.

El PCa es una enfermedad genéticamente heterogénea. Hecho que se pone de manifiesto por la elevada variabilidad clínica y las diferentes respuestas que existen para un mismo tratamiento. Esta variabilidad no queda solo patente entre pacientes de diferente origen étnico sino también entre individuos de una misma población¹¹⁷. Las variables clínicas empleadas clasifican de forma errónea a los pacientes lo que les lleva a un sobre/infratratamiento de éstos¹¹⁸. Por ello, se precisan nuevas herramientas que mejoren la precisión en el diagnóstico y estratificación de los pacientes, y los marcadores genéticos podrían ser los más adecuados. En la última década, el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento ha favorecido la identificación de variaciones genéticas asociadas con el PCa y su incorporación a la práctica clínica ofrece una oportunidad para facilitar las decisiones clínicas²¹.

En el PCa se asume una etiología multicausal y se cree que éste puede emerger a partir de múltiples variantes genéticas de baja penetrancia⁵⁵.

Por otra parte, la síntesis y el metabolismo de andrógenos son esenciales en el desarrollo y progresión del PCa¹¹⁹. Polimorfismos de genes que participan en estos procesos parecen influir en los niveles de andrógenos⁵⁶ y podrían llevar al desarrollo de tumores más agresivos.

En el estudio caso-control ninguno de los SNPs mostró diferencias significativas entre pacientes y controles. Por el contrario, cuando el análisis se centró en los pacientes con PCa, diferentes variantes genéticas se asociaron con características de PCa agresivo.

El gen CYP17A1 codifica una enzima clave en la síntesis esteroideogénica que produce mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos y estrógenos; con un papel crítico en el PCa⁶⁷; relacionándose alteraciones en su actividad con resistencia al tratamiento hormonal en modelos de PCa experimentales¹²⁰.

En nuestro estudio hayamos una asociación estadísticamente significativa de varios SNPs en el gen CYP17A1 con variables clínicas como el valor de PSA en el diagnóstico y el riesgo D'Amico. Los pacientes GG para el rs743572 los pacientes AA para el rs6162 y los AA para el rs6163 (p=0.054) tuvieron un mayor riesgo de presentar valores de PSA > 10 ng/ml. Además la sola presencia del alelo G para el rs743572, el alelo A para el rs6162 y el alelo A para el rs6163 se relacionó con un incremento del riesgo D'Amico.

Estos hallazgos pueden ser importantes para la práctica clínica habitual en el seguimiento de los pacientes ya que la ADT reduce los niveles de PSA y su incremento se relaciona con recurrencia bioquímica. En un estudio previo llevado a cabo en pacientes japoneses, estos tres SNPs, rs743572, rs6162 y rs6163 han sido asociados con progresión a CRPC tras la ADT⁷⁵. La presencia del rs6162 ha sido asociado con cambios en los niveles plasmáticos de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S), en pacientes caucásicos sometidos a ADT, lo que podría modificar los niveles de precursores de esteroides disponibles para la conversión intracrina a hormonas más potentes en tejidos y células prostáticas¹²¹. Además, el C17P17A1 es un blanco terapéutico importante en el tratamiento del PCa en estadios avanzados³⁹. El tratamiento con abiraterona reduce igualmente los niveles séricos de PSA y DHT y su efecto podría verse influenciado por la presencia de variantes en CYP17A1. De hecho, determinados polimorfismos en el gen CYP17A1 han mostrado un valor predictivo para la abiraterona, así, el rs2486758 ha sido relacionado con un menor tiempo de progresión bioquímica tras su administración¹²².

En nuestro estudio, ninguno de los SNPs de CYP17A1 se asoció con un incremento del riesgo de PCa. Sin embargo, una asociación entre los polimorfismos rs743572, rs6162 y

rs6163 y el riesgo de PCa ha sido previamente publicada ⁷¹ pero parece que dicha asociación sólo se mantiene en hombres de origen africano ⁷³. Dado que la población del presente estudio es caucásica, apoya nuestro resultado para estos SNPs.

Solo el rs6163 se asoció con un menor tiempo libre de recurrencia bioquímica en aquellos pacientes sometidos a prostatectomía radical. No hay muchos datos sobre marcadores genéticos en el metabolismo de los andrógenos como indicadores de respuesta tras la prostatectomía radical y ninguno sobre rs6163. *Wright* y colaboradores investigaron la asociación entre tres SNPs de CYP17A1 (rs743572, rs10883783 y rs17115100) y su respuesta al tratamiento (principalmente hormonal), pero no encontraron ninguna diferencia en el tiempo de recurrencia o progresión de la enfermedad y los distintos genotipos ¹²³. SNPs en otros genes del metabolismo de andrógenos como SRD5A y HSD17B, han mostrado una asociación con la recurrencia bioquímica tras la prostatectomía en pacientes asiáticos y caucásicos, respectivamente ^{124,125}.

El rs1004467, localizado en una región intrónica, no mostró asociación con ninguna variable clínica en nuestro estudio. No obstante, el rs1004467 se ha asociado previamente con progresión de la enfermedad tras la ADT ⁷⁵. Además, se ha mostrado que los niveles séricos de testosterona y DHT son más elevados en portadores del genotipo GG para este SNP ⁷⁴.

El rs743572 se encuentra en la región 5'UTR del gen y podría crear un sitio adicional de unión al factor Sp1, lo que incrementaría la transcripción génica ⁷⁰. Sin embargo, el rs6162 y el rs6163 son variantes sinónimas ya que no implican un cambio de aminoácido (H46H y S65S, respectivamente) y sus consecuencias a nivel funcional se desconocen.

Los resultados acerca del desequilibrio de ligamiento indican que los cuatro SNPs del gen CYP17A1 estudiados (rs743572, rs6162, rs6163 y rs1004467) están fuertemente ligados (estadístico D') y posiblemente se heredan en bloque. El análisis de haplotipos evidenció que la combinación de alelos GAAA de rs743572, rs6162, rs6163 y rs1004467, en este orden, se asocia con un incremento del riesgo D' Amico. No obstante, el menor riesgo que ofrece el haplotipo GAAA (OR=2.07) con respecto al de

los SNPs, rs743572, rs6162 y rs6163 por separado; las distintas frecuencias genotípicas y alélicas halladas para el rs1004467; y el hecho de que el valor del estadístico r^2 no corrobore dicho ligamiento, nos hace pensar que son rs743572, rs6162 y rs6163 los que confieren el peso del riesgo.

En relación a los genes ESR, a pesar de que el rs102677 (ESR1) no se asoció con ninguna variable clínica en el presente estudio, pero si fue previamente asociado con cambios en los niveles de esteroides en plasma y con una progresión de la enfermedad ¹²⁶. rs1062577 se localiza en la región 3'UTR del gen. La región 3' no traducida del gen determina la estabilización, localización, translocación y degradación del ARNm ¹²⁷. Análisis *in silico* indican que el cambio de alelo (T>A) en el rs1062577 genera un nuevo sitio de unión de miRNAs para el miR-3646, el miR-3662 y el miR-5585-3p ¹²⁸. En cáncer de mama, un tumor hormono-dependiente como el PCa, se ha visto que miR-3646 induce proliferación, migración e invasión celular ¹²⁹. Además el rs1062577 produce una pérdida del sitio de unión de los miRNAs, miR-186 y miR-6507-5p ¹²⁸. El miR-186 tiene un papel supresor en el PCa ¹³⁰, por lo que la presencia de este SNP podría relacionarse con un evento oncológico.

El rs1256049 (ESR2) se asoció con los diferentes grupos de riesgo, pero dicha asociación no se mantuvo en el análisis de regresión logística multivariante al analizar en conjunto el riesgo intermedio y alto; debido al bajo número de pacientes con genotipo CT para riesgo alto. Este SNP ha sido previamente asociado con un incremento del riesgo de PCa en los modelos genéticos codominantes y recesivos ^{63,131}. rs1256049 es una variante silenciosa que no produce cambio de aminoácido en la proteína (V328V) pero que parece tener un efecto directo en la modificación de la estructura secundaria del ARNm, lo que produce cambios en su estabilidad y patrones de traducción ⁶³

Para el gen LHCGR, el rs229275 mostró una tendencia de asociación con estadios tumorales localmente avanzados y avanzados (T3-T4). Otros investigadores han encontrado una asociación entre la incidencia de PCa y esta variante en diferentes grupos raciales; pero no en el caso del estadio de la enfermedad ⁶⁶. El rs2293275 produce una mutación con cambio de sentido lo que implica el cambio de aminoácido (N312S). La posición 312 se localiza en el exón 10 del gen, que es importante para la

activación del receptor de la de la hormona luteinizante y de la coriogonadotropina, sin embargo no ha mostrado consecuencias funcionales *in vitro* ¹³².

AR juega un papel crucial en la progresión del PCa ya que media la acción de los andrógenos y está frecuentemente sobreexpresado en estadíos avanzados ⁷⁹. Numerosos estudios sobre polimorfismos germinales y mutaciones somáticas se han llevado a cabo con resultados inconsistentes acerca de la importancia de las variaciones genéticas de AR en el PCa. El gen AR se localiza en el cromosoma X (Xq11-q12), por lo que los hombres tienen una sola copia del gen y un solo alelo representa el genotipo del individuo ¹³³.

En el presente trabajo el rs6152 (G>A) no ha mostrado diferencias significativas para ninguna variable del PCa. Al igual que nosotros, un estudio previo realizado en población caucásica no halló diferencias entre casos y controles para el rs6152; pero se ha descrito una asociación para este polimorfismo con estadíos avanzados de la enfermedad ⁸². A pesar de su falta de asociación con el riesgo de PCa, el alelo A del rs6152 ha sido asociado con una reducción del riesgo de alopecia androgénica por lo que se ha especulado que G pueda producir un incremento de la actividad de AR ⁸². El rs6152 se localiza en el exón 1 del gen que codifica el dominio N-terminal de la proteína, responsable de la actividad transcripcional del gen ¹³⁴. Sin embargo, rs6152 es una variante sinónima, en la que no se produce un cambio de amino ácido (E213E).

A priori el polimorfismo rs9332969 (G>A) del gen AR, parecía ser un atractivo candidato como biomarcador en PCa; que no había sido previamente genotipado en población caucásica. La sustitución de G por A en esta posición génica implica un cambio de aminoácido arginina por histidina en la posición 841 (R841H); que se traduce en una disrupción parcial de la funcionalidad de AR y conlleva una alteración de la interacción entre el receptor y los andrógenos ¹³⁵. Sin embargo en nuestra población de estudio no hubo variación alélica ya que el 100% de los pacientes y controles fueron portadores del alelo G.

Este estudio presenta una serie de *limitaciones*. Primero, debido al reducido tamaño muestral la potencia estadística es limitada. Además, el tamaño poblacional es insuficiente para evaluar la influencia del SNP rs9332969 debido a ser monomófico.

Segundo, la baja especificidad de la biopsia de próstata puede hacer que haya falsos negativos; hecho que tratamos de controlar realizando biopsias sistémicas de 20 núcleos paralelas y cercanas entre sí. Así mismo, a los individuos del grupo control no se les hizo un seguimiento durante el estudio para asegurar que no desarrollaron PCa tras la biopsia inicial negativa. Tercero, el periodo de observación para los pacientes fue relativamente pequeño (la media de seguimiento fue de 34.18 meses) y tan sólo una tercera parte de éstos presentaban un riesgo alto de recurrencia.

Por estas razones, los resultados del estudio deben ser tomados con cautela y requerirían de una validación en una gran cohorte en estudios posteriores; así que un mayor tiempo de seguimiento aseguraría unos resultados algo más prometedores. Sin embargo, reforzar que actualmente no existe estudio de esta envergadura realizados en la población caucásica, lo que realza el valor de los resultados expuestos.

2. SOBRE EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

En la actualidad el nivel de PSA, el estadio tumoral y la puntuación de Gleason son utilizados en la clínica para determinar la agresividad del tumor y la elección del tratamiento. No obstante pacientes con niveles similares de PSA, Gleason y estadio tumoral muestran distinta evolución clínica y tienen distintas respuestas debido a la heterogeneidad de los grupos a nivel molecular ¹³⁶.

Durante la caracterización de la delección 13q14 en la leucemia linfoblástica crónica de células B se evidenció por primera vez la implicación de los miRNAs en el cáncer. La delección de dicha región cromosómica implicaba la pérdida de expresión de los miRNAs (miR-15a y miR-16a) ¹³⁷. Desde entonces numerosos miRNAs han sido relacionados con la patogénesis del cáncer ⁹⁴. Por ello, el estudio de perfiles de expresión de miRNAs de los pacientes con PCa es atractivo para búsqueda de nuevos marcadores que identifiquen las diferencias existentes entre los grupos clínicos a nivel molecular.

En nuestro estudio investigamos la expresión diferencial de tres miRNAs, miR-141, miR-375 y miR-130b; en el tejido prostático de pacientes con PCa obtenido mediante biopsia diagnóstica. Los análisis de asociación llevados a cabo entre los datos de

expresión de los miRNAs y los parámetros clínicos (PSA, Gleason, estadio T y riesgo D'Amico) no mostraron resultados significativos. Del mismo modo, tampoco se halló una asociación entre los niveles de expresión de los miRNAs estudiados y la respuesta al tratamiento de dichos pacientes.

En estudios previos se ha descrito una sobreexpresión de miR-141 y miR-375 en el tejido de pacientes con PCa en comparación al tejido de próstata normal ¹⁰⁰. Altos niveles de miR-141 y miR-375 han sido también observados en el suero, en el plasma y en microvesículas circulantes en pacientes con enfermedad metastásica comparada con pacientes con PCa localizado o controles sanos ⁹⁸. *Brase* y colaboradores, además de corroborar la presencia de mayores niveles de miR-141 y miR-375 en el suero pacientes con una enfermedad avanzada, correlacionaron los niveles de expresión con tumores de alto riesgo (puntuación de Gleason ≥ 8 o metastásicos) y demostraron la sobreexpresión de ambos miRNAs en el tejido de pacientes con PCa frente al tejido sano ¹⁰¹. En otro estudio llevado a cabo en tejido de pacientes con PCa localizado recolectado tras una prostatectomía radical los niveles de expresión de miR-375 fueron mayores en los casos con una mayor puntuación de Gleason y estadio avanzado ¹³⁸.

Sin embargo, *Westermann* y colaboradores no hallaron un incremento en los niveles séricos de miR-141 entre pacientes con PCa y pacientes con biopsia negativa. Los niveles séricos de miR-141 fueron significativamente superiores en pacientes con mayor puntuación de Gleason ($p=0.049$), pero los investigadores no encontraron una correlación con el resto de parámetros clínicos analizados, nivel de PSA ($p=0.909$) y estadio tumoral ($p=0.148$) ¹³⁹.

La expresión de miR-141 y miR-375 ha sido igualmente evaluada como biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento. Un pequeño estudio piloto que incluyó 59 casos (recurrencia) y 59 controles no encontró diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-141 en tejido y el riesgo de recurrencia tras la prostatectomía radical ¹⁴⁰. Mientras, altos niveles de miR-375 en exosomas han sido asociados con una pobre supervivencia global en pacientes con CRPC ¹⁴¹.

Diversas investigaciones han tratado de dilucidar la función de miR-141 y miR-375 en el PCa con resultados discordantes. La expresión de miR-141 se ve incrementada por andrógenos y su sobreexpresión en células LNCaP conlleva un incremento de la proliferación celular. Otro estudio observó un incremento en el nivel de miR-141 y

miR-375 liberados al medio de cultivo de células LNCaP tras el tratamiento con andrógenos, lo que podría explicar los altos niveles que presentan en la sangre los pacientes con estadios avanzados de PCa¹⁰⁰. Así mismo, se ha demostrado que miR-141 incrementa la expresión de AR indirectamente a través de la represión de Shp, el cuál actúa como co-represor de AR¹⁰². Pero también se le ha atribuido a miR-141 un papel supresor de tumores ya que su expresión se ha encontrado reprimida en metástasis de PCa en hueso, y su sobreexpresión suprime la EMT, la invasión y la migración *in vitro* y reduce la metástasis ósea *in vivo*¹⁴².

MiR-375 se ha encontrado incrementado en líneas celulares de PCa en comparación con líneas celulares prostáticas benignas¹³⁸. Su sobreexpresión en las líneas tumorales LNCaP y DU145 provoca una represión del gen Sec23A y un incremento de la proliferación celular¹⁰³. Sin embargo, su sobreexpresión en la línea tumoral PC3 induce la MET (transición mesénquima-epitelio) inhibiendo la invasión *in vitro*¹⁰². Estas funciones opuestas podrían deberse a un papel dual de miR-375 en el PCa dependiendo del contexto celular. Un estudio *in vitro* ha mostrado que la represión miR-375 en la línea tumoral 22Rv1 (tiene una alta expresión de miR-375) y la expresión formada de miR-375 en la línea tumoral PC-3 atenúa el fenotipo tumoral en ambas, por lo que miR-375 actuaría como onco-miR en 22Rv1 y como supresor de tumores en PC-3. Los autores proponen que debido a la naturaleza heterogénea del PCa podría asumirse que miR-375 puede jugar un papel antagónico en los diferentes PCa (representados por las distintas líneas tumorales)¹³⁸.

La elección de un gen de referencia para normalizar la expresión de los miRNAs continúa siendo problemática y puede tener un impacto grave en los niveles reales de transcripción disponibles y, en consecuencia, en la interpretación biológica de los datos¹⁴³. En nuestro caso elegimos a RNU6B como normalizador ya que fue el candidato más estable, no obstante, también mostró variabilidad entre las muestras analizadas. Los pequeños ARNs no codificantes, RNU6 (RNU6A) y RNU6B, son los genes de referencia más frecuentemente utilizados como normalizadores. Sin embargo, no se tratan de miRNAs y en consecuencia, no parecen reflejar las características bioquímicas de las moléculas de miRNA en términos de su transcripción, procesamiento y patrones de expresión específicos del tejido. Se ha argumentado que es mejor normalizar miRNAs con genes de referencia que pertenezcan a la misma clase de ARN, puesto que

la extracción, transcripción inversa y amplificación de los snRNAs puede diferir a la de los miRNA introduciendo sesgo ¹⁴³.

A este respecto, miR-130b fue inicialmente propuesto como candidato normalizador de nuestro estudio. Sin embargo fue desechado como tal debido a su baja expresión (34% de los pacientes evaluados no lo expresaron). La estabilidad de miR-130b ha sido previamente analizada en tejido de PCa con distintos resultados. En un estudio llevado por *Schaefer* y colaboradores, el miR-130b fue el gen más estable entre los candidatos (miR-16, miR-130b, RNU6B y SNORD7) evaluados en tejido ¹⁰⁷. Contrariamente, miR-130b fue el candidato menos estable frente al resto de genes controles evaluados (RNU24, RNU44, RNU48, RNU43, MammU6 y RNU6B) en otro estudio llevado a cabo en tejido embebido en parafina; por lo que los autores sugirieron que miR-130b es un mal candidato como normalizador ¹⁰⁴.

Por otra parte, se ha identificado una represión de miR-130b en líneas celulares y tejido de PCa. Proponiendo que miR-130b podría delimitar la migración e invasión celular en el PCa mediante la represión de la expresión del gen MMP2 ¹⁰⁸. En contraposición, un reciente estudio ha demostrado que la sobreexpresión de miR-130b promueve invasión y resistencia a la terapia en las células LNCaP. Además de comprobar la sobreexpresión de miR-130b en pacientes metastásicos en comparación con los pacientes con PCa localizado; y una correlación entre su alta expresión y valores elevados de Gleason y estadío tumoral ¹⁴⁴.

Debido a la posible implicación de miR-130b en el PCa y a que durante su evaluación como gen normalizador observamos una baja estabilidad, decidimos analizar la expresión de miR-130b en el resto de pacientes con PCa y su posible relación con los parámetros clínico-patológicos. Pero, tal y como hemos expuesto anteriormente, no se observó una desregulación significativa en relación a los mismos.

El hecho de que ninguno de los miRNAs de nuestro estudio mostrara un papel pronóstico entre los pacientes evaluados, contradice los resultados mostrados en estudios anteriores. Sin embargo, hay importantes diferencias que pueden explicarlo como son: i) el diferente tamaño muestral; ii) el diferente tipo de muestra analizada: la mayor parte de los estudios analizan la expresión de miRNAs circulantes (obtenidos a

partir de plasma, suero o exosomas) y en aquellos casos que en los que se utiliza tejido, se trata una pieza tumoral fresca obtenida a partir de cirugía ¹⁴⁵.

Así mismo, existen otras fuentes de variabilidad que dificultan la comparación de resultados como: i) el método de conservación de la muestra (congelación o parafina; ii) el tiempo y el método de extracción del miRNA; iii) el método de caracterización (RT qPCR basada en SYBR Green o sondas Taqman o secuenciación) y de cuantificación de miRNAs; iv) los análisis estadísticos empleados ¹⁴⁵.

Por ello, una estandarización de los procedimientos experimentales y cohortes de estudio bien definidas son necesarias para una correcta comparación entre estudios y para su posible implementación como biomarcador en la clínica actual.

Los resultados de este estudio deben ser interpretados con cautela ya que somos conscientes de la presencia de ciertas limitaciones. Primero: la falta de controles para evaluar la estabilidad de los genes normalizadores en relación a los pacientes con PCa. Segundo: el uso de diferentes metodologías para la obtención de ADNc y para la determinación de la expresión entre los genes candidatos a normalizador y los miRNAs de estudio. Tercero: debido al carácter multifocal de PCa no podemos asegurar que el tejido analizado tenga la misma composición histológica que el tejido que analizó el patólogo. Cuarto: el corto tiempo de seguimiento de los pacientes y la ausencia de muestra para el análisis de la expresión de los miRNAs en el momento de recaída de los pacientes.

Así pues, en nuestro estudio la expresión de miR-141, de miR-375 o miR-130 en biopsias diagnósticas, no identificó tumores más agresivos ni predijo la respuesta al tratamiento. La falta de expresión diferencial asociada a las variables clínicas y recurrencia bioquímica deberá ser validada o negada en futuros estudios.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en cada uno de los estudios y la discusión de éstos, nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. SOBRE EL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE SNPS CON LA PRESENCIA TUMORAL Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

1. Las variantes incluidas en el estudio (rs6152, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 y rs1256049) pertenecientes a genes que participan en la síntesis y metabolismo de los esteroides sexuales, no muestran diferencias significativas entre pacientes con PCa y controles. Por lo tanto, estas variantes no se asocian con susceptibilidad en PCa en nuestra población de estudio.
2. Las variantes rs743572, rs6162 y rs6163 pertenecientes al gen CYP17A1 se asocian de forma significativa con el nivel de PSA en pacientes con PCa. Los pacientes GG, AA y AA para los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163 respectivamente, muestran un mayor riesgo de presentar valores de PSA más elevados durante el diagnóstico.
3. No existe una asociación significativa entre los SNPs de estudio (rs6152, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 y rs1256049) y la puntuación de Gleason.
4. El SNP rs2293275 ubicado en el gen LHCGR muestra una tendencia de asociación con estadios tumorales localmente avanzados y avanzados (T3-T4).
5. Los pacientes portadores de los alelos de riesgo G, A y A para el rs743572, el rs6162 y el rs6163 respectivamente (gen CYP17A1) tienen una mayor probabilidad de presentar un mayor riesgo D'Amico.
6. Los pacientes sometidos a prostatectomía radical portadores del alelo A en el SNP rs6163 (gen CYP17A1) presentan un menor tiempo libre de recurrencia bioquímica frente a los portadores del alelo C. Sin embargo, las diferencias en el tiempo de recurrencia bioquímica no son debidas específicamente a la presencia de dicha variante.

7. Los SNPs rs743572, el rs6162 y el rs6163; se encuentran en un fuerte desequilibrio de ligamiento formando un haplotipo que se transmite en bloque. Este hecho explica los resultados similares hallados para dichos polimorfismos.
8. El rs9332969 perteneciente al gen AR, a priori considerado por causar una disrupción parcial en la funcionalidad de AR, no muestra variabilidad en nuestra población ibérica y por lo tanto no es un buen candidato de estudio en esta población caucásica.
9. En general, podemos concluir que la presencia de variantes genéticas específicas de los genes CYP17A1 y LHCGR se relaciona agresividad en el PCa y su inclusión como biomarcadores podría ser útil en el manejo clínico de la enfermedad.

2. SOBRE EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miRNAs EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA

1. Dada la baja expresión y estabilidad de miR-130b mostrada en el tejido de pacientes con PCa, consideramos que éste no es un buen candidato como normalizador en estudios de expresión de miRNAs en tejido.
2. La expresión de los miRNAs, miR-141 y miR-375, previamente asociados con parámetros clínicos de agresividad y con progresión de la enfermedad, no se encuentra desregulada entre las distintas variables clínicas evaluadas (nivel de PSA en el diagnóstico, puntuación de Gleason, estadio T y riesgo D'Amico).
3. La expresión miR-130b no difiere en relación a los parámetros clínico-patológicos (nivel de PSA en el diagnóstico, puntuación de Gleason, estadio T y riesgo D'Amico) de los pacientes con PCa.
4. El nivel de expresión de los miRNAs estudiados no se correlaciona con el tiempo libre de recurrencia de bioquímica tras el inicio del tratamiento en pacientes con ADT, en pacientes que reciben radioterapia ni en aquellos sometidos a prostatectomía radical.
5. A pesar de que se ha propuesto a RNU6B como normalizador de la expresión de miRNAs en nuestro estudio, muestra variabilidad en su expresión. Este hecho

conlleva un sesgo en la normalización de los datos y dado que no existe un gen de referencia universal, se necesitan nuevas estrategias que mejoren dicha normalización.

6. En conjunto, la baja expresión de miR-141 y de miR-130b especialmente, así como la falta de un patrón de expresión diferencial de los miRNAs 141, 375 y 130b entre los diferentes grupos de pacientes con PCa en el tejido tumoral; nos hace sugerir que el análisis de su expresión no es útil para predecir la agresividad tumoral y la respuesta clínica a partir de las biopsias diagnósticas.

CONCLUSIONS

The obtained results and the discussion in each of previous studies allow us to draw the following conclusions:

1. ABOUT STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN SNPS, TUMOR PRESENCE AND CLINICAL CHARACTERISTICS IN PCa PATIENTS

1. The variants included in the study (rs6152, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 and rs1256049) involved to genes of the synthesis and metabolism of sex steroids, show no significant differences between PCa patients and controls. Therefore, these variants are not associated with PCa susceptibility in our study population.
2. The variants rs743572, rs6162 and rs6163 (CYP17A1 gene) are significantly associated with PSA level in PCa patients. Patients GG, AA and AA for rs743572, rs6162 and rs6163 respectively, showed an increased risk of higher PSA values at diagnosis.
3. There is no significant association between the study SNPs (rs6152, rs743572, rs6162, rs6163, rs1004467, rs2293275, rs1062577 and rs1256049) and the Gleason score.
4. The polymorphism rs2293275 located in the LHCGR gene shows a tendency of association with locally advanced and advanced tumor stages (T3-T4).
5. Patients with risk alleles rs743572 (G), rs6162 (A) and rs6163 (A) (CYP17A1 gene) were more likely to have a higher D'Amico risk.
6. Patients (A allele carriers) undergoing radical prostatectomy in the rs6163 (CYP17A1 gene) presented a shorter biochemical recurrence-free time compared to C allele carriers. However, differences in biochemical recurrence time were not specifically due to the presence of this variant.
7. SNPs rs743572, rs6162 and rs6163 are in a strong linkage disequilibrium forming a haplotype transmitted as a block. This fact explains similar found results for such polymorphisms.

8. The rs9332969 (AR gene), a priori considered to cause a partial disruption in the functionality of AR, did not show variability in our Iberian population and therefore it is not a good candidate for study in this Caucasian population.
9. In general, we can conclude that the presence of specific genetic variants of CYP17A1 and LHCGR genes are related to PCa aggressiveness; and their inclusion as biomarkers could be useful in disease clinical management.

2. ABOUT ANALYSIS OF miRNAs EXPRESSION IN PCa PATIENTS

1. Considering the low expression and stability of miR-130b presented in PCa tissue, we consider that it is not a good candidate as a housekeeping in miRNAs expression studies in tissue.
2. miR-141 and miR-375 expression, previously associated with clinical parameters of aggressiveness and with progression of the disease, was not deregulated among the different evaluated clinical variables (PSA in the diagnosis, Gleason score, T stage and D'Amico risk).
3. miR-130b expression did not differ in relation to the clinical-pathological parameters (PSA at diagnosis, Gleason score, T stage and D'Amico risk) of PCa patients .
4. Studied miRNAs expression levels did not correlate with biochemical recurrence free survival after the beginning of treatment in ADT patients, those receiving radiotherapy or in undergoing radical prostatectomy.
5. Although RNU6B has been proposed as housekeeping, it showed expression variability in our study. This fact implied a bias in the normalization of the data and since there is no universal reference gene, new strategies are needed to improve this normalization.
6. Overall, the low expression of miR-141 and miR-130b, as well as the lack of a differential miRNAs 141, 375 and 130b expression pattern between different PCa patients; it suggests that the analysis of its expression is not useful for predicting tumor aggressiveness and clinical response from diagnostic biopsies.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bhavsar, A. & Verma, S. Anatomic imaging of the prostate. *Biomed Res. Int.* **2014**, 728539 (2014).
2. Kumar, V. L. & Majumder, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int. Urol. Nephrol.* **27**, 231–43 (1995).
3. McNeal, J. E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**, 619–33 (1988).
4. Zhang, S. *An atlas of histology*. (Springer, 1999).
5. Prins, G. S. What is the prostate and what are its functions?
6. Chapple, C. R. & Steers, W. D. *Practical urology: essential principles and practice*. (Springer, 2011).
7. Robinson, B. D., Mosquera, J. M., Ro, J. Y. & Divatia, M. *Precision molecular pathology of prostate cancer*. (Springer, 2018).
8. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
9. SEOM. *Las Cifras del Cáncer en España*. (2017).
10. NIH. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Surveillance, Epidemiology, and E. R. P. Cancer of the Prostate - Cancer Stat Facts. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>. (Accessed: 30th August 2017)
11. Mandair, D., Rossi, R., Pericleous, M., Whyand, T. & Caplin, M. Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutr. Metab. (Lond)*. **11**, 30 (2014).
12. Lin, P.-H., Aronson, W. & Freedland, S. J. Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Med.* **13**, 3 (2015).
13. Parikesit, D., Mochtar, C. A., Umbas, R. & Hamid, A. R. A. H. The impact of obesity towards prostate diseases. *Prostate Int.* **4**, 1–6 (2016).
14. Allott, E. H. & Hursting, S. D. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocr. Relat. Cancer* **22**, R365-86 (2015).
15. Ballon-Landa, E. & Parsons, J. K. Nutrition, physical activity, and lifestyle factors in prostate cancer prevention. *Curr. Opin. Urol.* **28**, 1 (2017).
16. Leitzmann, M. F. & Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **4**, 1–11 (2012).
17. Huncharek, M., Haddock, K. S., Reid, R. & Kupelnick, B. Smoking as a Risk Factor for Prostate Cancer: A Meta-Analysis of 24 Prospective Cohort Studies.

- Am. J. Public Health* **100**, 693–701 (2010).
18. Islami, F., Moreira, D. M., Boffetta, P. & Freedland, S. J. A Systematic Review and Meta-analysis of Tobacco Use and Prostate Cancer Mortality and Incidence in Prospective Cohort Studies. *Eur. Urol.* **66**, 1054–1064 (2014).
 19. Su, J. & Fontham, E. T. Prostate cancer: an occupational hazard? *Futur. Oncol* **10**, 903–906 (2014).
 20. Wang, K. *et al.* Association between age-related reductions in testosterone and risk of prostate cancer-An analysis of patients' data with prostatic diseases. *Int. J. cancer* **141**, 1783–1793 (2017).
 21. Helfand, B. T., Catalona, W. J. & Xu, J. A genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment. *Curr. Opin. Urol.* **25**, 53–8 (2015).
 22. Eeles, R. *et al.* The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 18–31 (2014).
 23. Prostate Cancer Foundation. What are Prostate Cancer Symptoms? Prostate Cancer Foundation. Available at: <https://www.pcf.org/c/prostate-cancer-symptoms/>. (Accessed: 30th August 2017)
 24. N. Mottet (Chair), J. Bellmunt, E. B. (Patient, Representative), R. C. N. van den B. (Guidelines A.), M. Bolla, N.J. van Casteren (Guidelines Associate), P. C., S. Culine, S. Joniau, T. Lam, M.D. Mason, V. M. & H. van der Poel, T.H. van der Kwast, O. Rouvière, T. W. EAU -Guidelines on Prostate Cancer. (2015).
 25. Harvey, C. J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U. & Frauscher, F. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *Br. J. Radiol.* **85**, S3–S17 (2012).
 26. Salman, J. W., Schoots, I. G., Carlsson, S. V., Jenster, G. & Roobol, M. J. Prostate Specific Antigen as a Tumor Marker in Prostate Cancer: Biochemical and Clinical Aspects. in *Advances in experimental medicine and biology* **867**, 93–114 (2015).
 27. Obort, A. S., Ajadi, M. B. & Akinloye, O. Prostate-specific antigen: any successor in sight? *Rev. Urol.* **15**, 97–107 (2013).
 28. Loeb, S. & Catalona, W. J. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* **6**, 74–77 (2014).
 29. Sapre, N. & Selth, L. A. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Prostate Cancer: The State of Play. *Prostate Cancer* **2013**, 539680 (2013).
 30. Philip, J., Dutta Roy, S., Ballal, M., Foster, C. S. & Javle, P. Is a digital rectal

- examination necessary in the diagnosis and clinical staging of early prostate cancer? *BJU Int.* **95**, 969–971 (2005).
31. Quon, J. S. *et al.* False positive and false negative diagnoses of prostate cancer at multi-parametric prostate MRI in active surveillance. *Insights Imaging* **6**, 449–63 (2015).
 32. Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **17**, 292–306 (2004).
 33. Chen, N. & Zhou, Q. The evolving Gleason grading system. *Chin. J. Cancer Res.* **28**, 58–64 (2016).
 34. Magi-Galluzzi, C., Montironi, R. & Epstein, J. I. Contemporary Gleason grading and novel Grade Groups in clinical practice. *Curr. Opin. Urol.* **26**, 488–492 (2016).
 35. Epstein, J. I. *et al.* A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur. Urol.* **69**, 428–35 (2016).
 36. Gordetsky, J. & Epstein, J. Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn. Pathol.* **11**, 25 (2016).
 37. Hoogland, A. M., Kweldam, C. F. & van Leenders, G. J. L. H. Prognostic histopathological and molecular markers on prostate cancer needle-biopsies: a review. *Biomed Res. Int.* **2014**, 341324 (2014).
 38. Nishiyama, T. Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation: A comprehensive review of the literature. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **32**, 38.e17-38.e28 (2014).
 39. Sridhar, S. S. *et al.* Castration-Resistant Prostate Cancer: From New Pathophysiology to New Treatment. *Eur. Urol.* **65**, 289–299 (2014).
 40. Karantanos, T., Corn, P. G. & Thompson, T. C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 5501–11 (2013).
 41. Corradi, P. F., Corradi, R. B. & Greene, L. W. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urol. Clin. North Am.* **43**, 151–162 (2016).
 42. Luu-The, V., Bélanger, A. & Labrie, F. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 207–221 (2008).
 43. Schiewer, M. J., Augello, M. A. & Knudsen, K. E. The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **352**, 34–45 (2012).
 44. Nakamura, Y., Mcnamara, K. M. & Sasano, H. Estrogen Receptor Expression

- and its Relevant Signaling Pathway in Prostate Cancer: A Target of Therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 392–400 (2012).
45. Prins, G. S. & Korach, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **73**, 233–244 (2008).
46. Nelles, J. L., Hu, W.-Y. & Prins, G. S. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **6**, 437–451 (2011).
47. Ellem, S. J. & Risbridger, G. P. Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 621–627 (2007).
48. Saini, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **39**, 97–106 (2016).
49. Collins, F. S. *et al.* New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science* **282**, 682–9 (1998).
50. Shastry, B. S. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J. Hum. Genet.* **52**, 871–80 (2007).
51. Kassam, S., Meyer, P., Corfield, A., Mikuz, G. & Sergi, C. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): History, Biotechnological Outlook and Practical Applications. *Curr. Pharmacogenomics* **3**, 237–245 (2005).
52. NCBI. dbSNP Overview. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/get_html.cgi?whichHtml=overview. (Accessed: 7th May 2018)
53. Sauna, Z. E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S. V & Gottesman, M. M. The sounds of silence: synonymous mutations affect function. *Pharmacogenomics* **8**, 527–532 (2007).
54. Wang, G.-S. & Cooper, T. A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 749–761 (2007).
55. Demichelis, F. & Stanford, J. L. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **33**, 75–84 (2015).
56. Salvi, S. *et al.* Impact of Candidate Genetic Polymorphisms in Prostate Cancer: An Overview. *Mol. Diagn. Ther.* **20**, 1–12 (2016).
57. Nakagawa, H. Prostate cancer genomics by high-throughput technologies: genome-wide association study and sequencing analysis. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, R171–R181 (2013).
58. Bensen, J. T. *et al.* Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a

- case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate* **73**, 11–22 (2013).
59. Aly, M. *et al.* Polygenic Risk Score Improves Prostate Cancer Risk Prediction: Results from the Stockholm-1 Cohort Study. *Eur. Urol.* **60**, 21–28 (2011).
 60. Huang, S.-P. *et al.* Prognostic Significance of Prostate Cancer Susceptibility Variants on Prostate-Specific Antigen Recurrence after Radical Prostatectomy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 3068–3074 (2009).
 61. Bao, B.-Y. *et al.* Significant associations of prostate cancer susceptibility variants with survival in patients treated with androgen-deprivation therapy. *Int. J. cancer* **130**, 876–84 (2012).
 62. Schleutker, J. Polymorphisms in androgen signaling pathway predisposing to prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **360**, 25–37 (2012).
 63. Fu, C., Dong, W.-Q., Wang, A. & Qiu, G. The influence of ESR1 rs9340799 and ESR2 rs1256049 polymorphisms on prostate cancer risk. doi:10.1007/s13277-014-2086-7
 64. Troppmann, B., Kleinau, G., Krause, G. & Gromoll, J. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Hum. Reprod. Update* **19**, 583–602 (2013).
 65. Xiong, S. *et al.* Effects of luteinizing hormone receptor signaling in prostate cancer cells. *Prostate* **75**, 141–150 (2015).
 66. Ingles, S. A., Liu, S. V & Pinski, J. LHRH and LHR genotypes and prostate cancer incidence and survival. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **4**, 228–34 (2013).
 67. Yadav, R., Petrunak, E. M., Estrada, D. F. & Scott, E. E. Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **441**, 68–75 (2017).
 68. Gilep, A. A., Sushko, T. A. & Usanov, S. A. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: The role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 200–209 (2011).
 69. Sushko, T. A., Gilep, A. A. & Usanov, S. A. Genetics, structure, function, mode of actions and role in cancer development of CYP17. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **14**, 66–76 (2014).
 70. Rai, R., Sharma, K. L., Misra, S., Kumar, A. & Mittal, B. CYP17 polymorphism (rs743572) is associated with increased risk of gallbladder cancer in tobacco

- users. doi:10.1007/s13277-014-1876-2
71. Sarma, A. V *et al.* Genetic polymorphisms in CYP17, CYP3A4, CYP19A1, SRD5A2, IGF-1, and IGFBP-3 and prostate cancer risk in African-American men: the Flint Men's Health Study. *Prostate* **68**, 296–305 (2008).
 72. Cussenot, O. *et al.* Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3596–602 (2007).
 73. Wang, Y. *et al.* Quantitative Assessment of the Association Between CYP17 rs743572 Polymorphism and Prostate Cancer Risk. *Cell Biochem. Biophys.* **71**, 983–991 (2015).
 74. Poniah, P. *et al.* Genetic polymorphisms in the androgen metabolism pathway and risk of prostate cancer in low incidence Malaysian ethnic groups. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 19232–40 (2015).
 75. Yamada, T. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP17A1 in steroidogenesis pathway are associated with risk of progression to castration-resistant prostate cancer in Japanese men receiving androgen deprivation therapy. *Int. J. Clin. Oncol.* **18**, 711–717 (2013).
 76. Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K. & Yong, E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 3–23 (2015).
 77. Strauss, J. F. (Jerome F. & Barbieri, R. L. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management.* (Saunders/Elsevier, 2009).
 78. Davey, R. A. & Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin. Biochem. Rev.* **37**, 3–15 (2016).
 79. Schalken, J. & Fitzpatrick, J. M. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.* **117**, 215–225 (2016).
 80. Li, J., Mercer, E., Gou, X. & Lu, Y.-J. Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes. *Am. J. Cancer Res.* **3**, 127–51 (2013).
 81. Weng, H. *et al.* Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 40554 (2017).
 82. Hayes, V. M. *et al.* The E211 G>A androgen receptor polymorphism is

- associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 993–6 (2005).
83. Monteiro, C. *et al.* Genetic variants in AR and SHBG and resistance to hormonal castration in prostate cancer. *Med. Oncol.* **30**, 490 (2013).
 84. Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G. & Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* **16**, 4–20 (2017).
 85. Zhao, Y. *et al.* Association of estrogen receptor α PvuII and XbaI polymorphisms with prostate cancer susceptibility and risk stratification: a meta-analysis from case-control studies. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 3203–3210 (2017).
 86. Lévesque, É. *et al.* Molecular markers in Key Steroidogenic Pathways, Circulating steroid. (2013). doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2812
 87. Thellenberg-Karlsson, C. *et al.* Estrogen Receptor Polymorphism Is Associated with Prostate Cancer Risk. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1936–1941 (2006).
 88. Fabris, L. *et al.* The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. *Eur. Urol.* **70**, 312–22 (2016).
 89. Jansson, M. D. & Lund, A. H. MicroRNA and cancer. *Mol. Oncol.* **6**, 590–610 (2012).
 90. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **39**, D152–D157 (2011).
 91. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 15004 (2016).
 92. Ayub, S. G., Kaul, D. & Ayub, T. Microdissecting the role of microRNAs in the pathogenesis of prostate cancer. *Cancer Genet.* **208**, 289–302 (2015).
 93. Endzeliņš, E. *et al.* Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Mol. Cancer* **15**, 41 (2016).
 94. Filella, X. & Foj, L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 715–736 (2017).
 95. Schaefer, A. *et al.* Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int. J. cancer* **126**, 1166–76 (2010).
 96. Cannistraci, A., Di Pace, A. L., De Maria, R. & Bonci, D. MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples. *Biomed Res. Int.* **2014**, 146170 (2014).
 97. Sharova, E. *et al.* A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate

- cancer screening. *Br. J. Cancer* **114**, 1362–1366 (2016).
98. Nguyen, H. C. N. *et al.* Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate* **73**, 346–54 (2013).
99. Kojima, S., Goto, Y. & Naya, Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. *J. Hum. Genet.* **62**, 25–31 (2017).
100. Rönnau, C. G. H., Verhaegh, G. W., Luna-Velez, M. V & Schalken, J. A. Noncoding RNAs as novel biomarkers in prostate cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**, 591703 (2014).
101. Brase, J. C. *et al.* Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **128**, 608–616 (2011).
102. Massillo, C., Dalton, G. N., Farré, P. L., De Luca, P. & De Siervi, A. Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction* **154**, R81–R97 (2017).
103. Szczyrba, J. *et al.* Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **9**, 791–800 (2011).
104. Carlsson, J. *et al.* Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues. *Cancer Genet. Cytogenet.* **202**, 71–5 (2010).
105. Kozera, B. & Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* **54**, 391–406 (2013).
106. DAS, M. K., Andreassen, R., Haugen, T. B. & Furu, K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* **13**, 63–8
107. Schaefer, A. *et al.* Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp. Mol. Med.* **42**, 749–58 (2010).
108. Chen, Q. *et al.* MiR-130b suppresses prostate cancer metastasis through down-regulation of MMP2. *Mol. Carcinog.* **54**, 1292–300 (2015).
109. Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R. & Moreno, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**, 1928–1929 (2006).
110. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
111. Wang, J. & Shete, S. Testing Departure from Hardy–Weinberg Proportions. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **850**, 77–102 (2012).

112. Slatkin, M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 477–485 (2008).
113. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–50 (2004).
114. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509–15 (2004).
115. Jacquard, A. *The Genetic Structure of Populations*. (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
116. Song, C. *et al.* miR-141-3p Suppresses Expression of Androgen Receptors and Functions as a Tumor Suppressor Gene in Prostate Carcinogenesis. *Int. J. Clin. Med.* **8**, 55–55 (2017).
117. Boyd, L. K., Mao, X. & Lu, Y.-J. The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 652–664 (2012).
118. Colicchia, M., Morlacco, A., Cheville, J. C. & Karnes, R. J. Genomic tests to guide prostate cancer management following diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 367–377 (2017).
119. Fujimoto, N., Shiota, M., Tomisaki, I. & Minato, A. Gene Polymorphism-related Individual and Interracial Differences in the Outcomes of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Clin. Genitourin. Cancer* **15**, 337–342 (2017).
120. Mostaghel, E. A. *et al.* Resistance to CYP17A1 Inhibition with Abiraterone in Castration-Resistant Prostate Cancer: Induction of Steroidogenesis and Androgen Receptor Splice Variants. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5913–5925 (2011).
121. Levesque, E. *et al.* Molecular Markers in Key Steroidogenic Pathways, Circulating Steroid Levels, and Prostate Cancer Progression. *Clin. Cancer Res.* **19**, 699–709 (2013).
122. Binder, M. *et al.* Common Genetic Variation in CYP17A1 and Response to Abiraterone Acetate in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1097 (2016).
123. Wright, J. L. *et al.* CYP17 polymorphisms and prostate cancer outcomes. *Prostate* **70**, 1094–1101 (2010).

124. Audet-Walsh, E. *et al.* SRD5A Polymorphisms and Biochemical Failure After Radical Prostatectomy. *Eur. Urol.* **60**, 1226–1234 (2011).
125. Audet-Walsh, É. *et al.* The Impact of Germline Genetic Variations in Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenases on Prostate Cancer Outcomes After Prostatectomy. *Eur. Urol.* **62**, 88–96 (2012).
126. Lévesque, É. *et al.* Molecular markers in key steroidogenic pathways, circulating steroid levels, and prostate cancer progression. *Clin. Cancer Res.* **19**, 699–709 (2013).
127. Hrstka, R., Matoulkova, E., Michalova, E. & Vojtesek, B. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *www.landesbioscience.com RNA Biol. RNA Biol.* **95**, 563–576 (2012).
128. Gong, J. *et al.* Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* **33**, 254–263 (2012).
129. Tao, S. *et al.* miR-3646 promotes cell proliferation, migration, and invasion via regulating G2/M transition in human breast cancer cells. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 1659–77 (2016).
130. Hua, X. *et al.* miR-186 inhibits cell proliferation of prostate cancer by targeting GOLPH3. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 1650–60 (2016).
131. Dai, Z.-J. *et al.* Current evidence on the relationship between rs1256049 polymorphism in estrogen receptor- β gene and cancer risk. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7**, 5031–40 (2014).
132. Piersma, D. *et al.* Polymorphic variations in exon 10 of the luteinizing hormone receptor: Functional consequences and associations with breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **276**, 63–70 (2007).
133. Spatz, A., Borg, C. & Feunteun, J. X-Chromosome Genetics and Human Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 617–629 (2004).
134. Maney, D. L. Polymorphisms in sex steroid receptors: From gene sequence to behavior. *Front. Neuroendocrinol.* **47**, 47–65 (2017).
135. Disciglio, V. *et al.* Whole exome sequencing and single nucleotide polymorphism array analyses to identify germline alterations in genes associated with testosterone metabolism in a patient with androgen insensitivity syndrome and early-onset colorectal cancer. *Chin. J. Cancer* **35**, 51 (2016).

136. Tosoian, J. J. & Antonarakis, E. S. Molecular heterogeneity of localized prostate cancer: more different than alike. *Transl. Cancer Res.* **6**, S47–S50 (2017).
137. Calin, G. A. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15524–15529 (2002).
138. Costa-Pinheiro, P. *et al.* MicroRNA-375 plays a dual role in prostate carcinogenesis. *Clin. Epigenetics* **7**, 42 (2015).
139. Westermann, A. M. *et al.* Serum microRNAs as biomarkers in patients undergoing prostate biopsy: results from a prospective multi-center study. *Anticancer Res.* **34**, 665–9 (2014).
140. Zheng, Q. *et al.* Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 expression levels in prostate adenocarcinoma for associated risk of recurrence after radical prostatectomy. *Prostate* **74**, 1655–62 (2014).
141. Huang, X. *et al.* Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **67**, 33–41 (2015).
142. Huang, S. *et al.* Downregulation of miR-141-3p promotes bone metastasis via activating NF- κ B signaling in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 173 (2017).
143. Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G. & Pantel, K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin. Chem.* **61**, 1333–42 (2015).
144. Cannistraci, A. *et al.* C-Met/miR-130b axis as novel mechanism and biomarker for castration resistance state acquisition. *Oncogene* **36**, 3718–3728 (2017).
145. Rice, J. *et al.* Assay Reproducibility in Clinical Studies of Plasma miRNA. *PLoS One* **10**, e0121948 (2015).

ANEXOS

PROTOSCOLOS

I. Extracción Orgánica de ADN (fenol:cloroformo:alcoholisoamílico)

1. Añadir 20 μ l de sangre a un tubo eppendorf.
2. Agregar a la muestra de sangre 300 μ l de buffer de lisis (10 mM Tris-CIH, 100 mMNaCl, 39 mMDDTT, 10 Mm EDTA, 2% SDS), 7.5 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 12 μ l de DTT (1M).
3. Agitar e incubar a 56°C overnight.
4. Añadir 300 μ l de fenol:cloroformo:alcoholisoamílico 24:25:1 (10 mM Tris, pH 8.0m, 1 mM EDTA, (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) a cada muestra.
5. Agitar en el vórtex hasta que se forme una solución lechosa y centrifugar a máxima velocidad (13.000 rpm) durante 3 minutos para separar las fases orgánica y acuosa.
6. Hidratar un filtro *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugation* (100 kDa), (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania) por muestra, añadiendo 100 μ l de H₂O estéril, e introducirlo en el tubo del kit.
7. Una vez separadas las fases, recuperar la fase superior acuosa que contiene el ADN y transferirla al tubo con filtro Amicon previamente hidratado.
8. Centrifugar a 3.500 rpm durante 20 minutos.
9. Tirar el filtrado y añadir 150 μ l de H₂O estéril al tubo. Repetir la centrifugación anterior.
10. Volver a repetir el paso 9.
11. Añadir 100 μ l de H₂O al tubo para eludir el ADN. Resuspender con la pipeta varias veces y lavar las paredes de la membrana.
12. Pasar el filtro Amicon a un nuevo tubo del kit, invirtiendo la membrana.
13. Centrifugar a 5.500 rpm durante 5 minutos.
14. Descartar el filtro y guardar el tubo, que es el que contiene el ADN.

II. Extracción de ARN con Trizol/cloroformo.

(A lo largo de todo el protocolo, trabajar en hielo el máximo tiempo posible)

1. Mantener los tubos que contienen las muestras de tejido en hielo durante su descongelación.
2. Rotular un tubo eppendorf/muestra de 2ml y añadirle 800 µl de Trizol® (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) a temperatura ambiente. Dejar 5 minutos.
3. Añadir 1ml la pieza de tejido y dejar actuar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Someter la muestra a sonicación (baño de ultrasonidos) para completar la homogenización del tejido. Añadir 600 ml de agua al sonicador y realizar 3 ciclos de sonicación de 3 minutos cada uno, dejando 1 minuto de descanso entre ciclo y ciclo.
5. Añadir 160 µl de cloroformo, agitar vigorosamente durante 15 segundos y dejar actuar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
6. Volver a agitar las muestras y centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 2°C.
7. Preparar un nuevo tubo eppendorf/muestra de 2ml, roturarlo y añadir 400 µl de isopropanol.
8. Pasar el sobrenadante (fase superior transparente) al nuevo tubo que contiene isopropanol, evitando arrastrar la fase blanca proteica y desechar el tubo.
9. Mezclar bien por inversión del nuevo tubo y centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 2°C.
10. Tirar el sobrenadante volcando el tubo y arrastrarlo sobre un papel absorbente sin dar golpes bruscos para no levantar el pellet que alberga el ARN.
11. Resuspender el pellet en 800 µl de etanol al 70%.
12. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a 2°C.
13. Tirar el sobrenadante volcándolo sobre un papel absorbente, evitando dar golpes bruscos.
14. Dejar los tubos abiertos e inclinados boca abajo durante 30 minutos para evaporar el resto de etanol que haya podido quedar.
15. Resuspender el pellet en 60 µl de H₂O libre de RNAasas y tapar bien. Mantener en frío.
16. Conservar a -80 °C.

ARTÍCULO ORIGINAL



RESEARCH ARTICLE

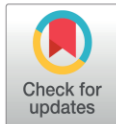
Association between polymorphisms in sex hormones synthesis and metabolism and prostate cancer aggressiveness

Inmaculada Robles-Fernandez¹, Luis Javier Martinez-Gonzalez¹, Manrique Pascual-Geler², Jose Manuel Cozar², Ignacio Puche-Sanz², Maria Jose Serrano^{1,3}, Jose Antonio Lorente^{1,4}, Maria Jesus Alvarez-Cubero^{1,5} *

1 GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government. Granada, Spain, **2** Urology Department, University Hospital Virgen de las Nieves. Granada, Spain, **3** Integral Oncology Division, Clinical University Hospital. Granada, Spain, **4** Laboratory of Genetic Identification, University of Granada—Department of Legal Medicine—Faculty of Medicine, Granada, Spain, **5** Cell Biology Department, University of Granada- Faculty of Sciences, Granada, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* mjesusac@ugr.es



OPEN ACCESS

Citation: Robles-Fernandez I, Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M, Cozar JM, Puche-Sanz I, Serrano MJ, et al. (2017) Association between polymorphisms in sex hormones synthesis and metabolism and prostate cancer aggressiveness. PLoS ONE 12(10): e0185447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447>

Editor: Chih-Pin Chuu, National Health Research Institutes, TAIWAN

Received: July 6, 2017

Accepted: September 12, 2017

Published: October 5, 2017

Copyright: © 2017 Robles-Fernandez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Novel biomarkers for prostate cancer (PCa) diagnosis and prognosis are necessary to improve the accuracy of current ones employed in clinic. We performed a retrospective study between the association of several polymorphisms in the main genes involved in the synthesis and metabolism of sex hormones and PCa risk and aggressiveness. A total of 311 Caucasian men (155 controls and 156 patients) were genotyped for 9 SNPs in *AR*, *CYP17A1*, *LHCGR*, *ESR1* and *ESR2* genes. Diagnostic PSA serum levels, Gleason score, tumor stage, D'Amico risk and data of clinical progression were obtained for patients at the moment of the diagnosis and after 54 months of follow-up. Chi-squared test were used for comparisons between clinical variables groups, logistic regression for clinical variables associations between SNPs; and Kaplan–Meier for the association between SNPs and time to biochemical progression. We found 5 variants (*CYP17A1*) rs743572, rs6162, rs6163; (*LHCGR*) rs2293275 and (*ESR2*) rs1256049 that were statistically significant according to clinical variables (PSA, D'Amico risk and T stage) on a case-case analysis. Moreover, the presence of *A* and *G* alleles in rs743572 and rs6162 respectively, increase the risk of higher PSA levels (>10 ng/μl). With respect to D'Amico risk rs743572 (*AG-GG*), rs6162 (*AG-AA*) and rs6163 (*AC-AA*) were associated with an increased risk; and last, *AC* and *AA* genotypes for rs6163 were associated with a shorter biochemical recurrence free survival (BRFS) in patients with radical prostatectomy. In multigene analysis, several variants in SNPs rs2293275, rs6152, rs1062577, rs6162, rs6163, rs1256049 and rs1004467 were described to be associated with a more aggressiveness in patients. However, none of the selected SNPs show significant values between patients and controls. In conclusion, this study identified inherited variants in genes *CYP17A1*, *LHCGR* and *ESR2* related to more aggressiveness and/or a poor progression of the disease. According to this study, new promise PCa biomarkers for clinical management could be included in these previous SNPs.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is one of the most prevalent cancers diagnosed in men with 1.1 million cases worldwide in 2012 [1]. However, few conclusive studies have been performed with regard to the genetics of this cancer. One of the main challenges is to find new specific biomarkers that allow clinicians to detect the disease at an early stage, refine risk stratification, and control the course of patients.

So far, only clinical risk classifications, such as that of D'Amico [2], have gained enough evidence to be implemented in routine practice. However, a limitation of these classifications is the lack of integration with other known risk factors and genomic data, which could provide a more personalized risk assessment. Although a number of genomic classifications, such as *FGFR1*, *CDKN1A* and *PMP22* genes [3], have demonstrated their ability to differentiate between low and high-risk patients [3–5], none of them are currently adopted in routine clinical practice [6]. In the same way, there are not genetic biomarkers in the clinical to predict the outcome to different treatments used to attend PCa patients [7].

Androgens play a pivotal role in the development and function of prostate as well as in the pathogenesis and progression of PCa [8]. Moreover, experimental and epidemiological data have suggested that also estrogen signaling may contribute to PCa development and progression [9]. Although recent studies have evaluated polymorphisms in sex hormone metabolism genes, such as *AR*, *SRD5A2*, *CYP17A1* or *ESR* as PCa risk factors [10–12] they did not provide conclusive results.

The aim of the present study was to analyze several SNPs of genes related to the synthesis and metabolism of steroid hormones, such as *CYP17A1* gene (rs743572, rs6162, rs6163 and rs1004467); luteinizing hormone chorionic gonadotropin hormone receptor (*LHCGR*) gene (rs2293275); androgen receptor (*AR*) gene (rs6152 and rs9332696); and estrogen receptor (*ESR1* and *ESR2*) genes (rs1062577 and rs1256049, respectively). We designed a genetic analysis in these 9 SNPs in order to find out genetic associations with PCa risk, biochemical recurrence and/or clinical stratification.

Materials and methods

Patients

From 2012 to 2014, a total of 311 subjects with PSA levels ≥ 4.0 ng/mL meeting the criteria for a prostate biopsy were included in this study (Table 1). Patients with positive biopsy were analyzed for T stage, serum PSA, Gleason score and were classified according to D'Amico risk classification (low, intermediate and high risk). Negative biopsy individuals were considered as controls. All individuals underwent a systematic 20-core ultrasound guided biopsy in order to limit the false negative rate. After primary therapy PSA was monitored every 3 or 6 months to evaluate the existence of biochemical recurrence. All subjects of the study provided a written informed consent to be enrolled, which was previously approved by the Research Ethics Committee of Granada Center (CEI-Granada) following Helsinki ethical declaration.

SNPs selection and genotyping

Immediately before the biopsy, a peripheral blood sample was extracted from patients, put into EDTA coated tubes and stored at -20°C until genomic DNA extraction. A standard organic extraction procedure by phenol/chloroform/isoamyl alcohol and proteinase K, followed by purification with Microcon H 100 filters (Millipore, Germany) was used. To determine extracted DNA purity and concentration a NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA) was used. Thereafter, DNA was stored at -20°C until genotyping. Five genes involved both directly or indirectly, in androgen synthesis and/or its metabolism were selected: *CYP17A1*,

Table 1. Summary of clinical variables.

	Patients n = 156		Controls n = 155	
	n	%	n	%
Initial PSA (ng/ml)				
> 4 ≤ 10	84	(53.8)	106	(68.4)
> 10 ≤ 20	33	(21.2)	47	(30.3)
> 20	39	(25)	2	(1.3)
Gleason Score				
≤ 7	132	(84.6)		n.a.
8–10	24	(15.4)		n.a.
T Stage				
T 1–2	137	(87.8)		n.a.
T 3–4	10	(6.4)		n.a.
Missing	9	(5.8)		
D'Amico Risk Group				
Low	54	(34.6)		n.a.
Medium	54	(34.6)		n.a.
High	45	(28.8)		n.a.
Missing	3	(1.9)		
Observation Period				
Median (months)		34.18		n.a.
Range (months)		1–54		n.a.
Missing		8		n.a.

Classification of patients was made following the EAU guidelines on PCa. All subjects included in the study were Caucasian, specifically Iberian. n: total numbers of samples; n.a.: not applicable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447.t001>

AR, LHCGR, ESR1 and ESR2 and the picked SNPs were rs6162, rs743572, rs6163 and rs1004467 for CYP17A1; rs6152 and rs9332969 for AR; rs2293275 for LHCGR; rs1062577 for ESR1; and rs1256049 for ESR2 (S1 Table). SNPs in these genes were selected using The National Center for Biotechnology Information website [13].

DNA genotyping was performed using TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, USA) which included all essential components (except probes, templates and water) for polymerase chain reaction (PCR). Allelic discrimination assays were carried out in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Results were read using SDS software v.2.4 (Applied Biosystems, USA). In order to warrant the results of genotyping we carried out a validation assay by Sanger sequencing (S2 Table). The validation cohort comprised a 3% of the genotyped samples (randomly selected) for each single SNP.

Statistical analysis

Software package SPSS v.22 was used for statistical analyses (IBM Corporation, USA). The analyses included chi-square and Fisher exact tests for small samples size. The association between clinical variables and SNPs were analyzed by a binary logistic regression using different genetic models. Binary logistic regression was adjusted for PSA levels at diagnosis time, Gleason score, T stage and/or age. The biochemical recurrence free survival (BRFS) interval was estimated with Kaplan–Meier analysis and significance was determined by log-rank test. Cox regression analysis was used to assess the association of genetic variants and BRFS adjusting for PSA level at diagnosis, Gleason score, T stage and age. Statistical significance was

considered with p values ≤ 0.05 . Genotypes analyses as well as Hardy–Weinberg equilibrium and Linkage disequilibrium (LD) analyses were performed using the online SNPStats software [14]. SNPs were in LD when they had a value of $r^2 > 0.5$.

Results

Nine SNPs across *AR*, *CYP17A1*, *LHCGR*, *ESR1* and *ESR2* genes were successfully genotyped in the total cohort ($n = 311$).

In the case of rs9332969 (*AR* gene is in X chromosome), all individuals were hemizygous for the *G* allele so it was discarded for later analyses.

Hardy–Weinberg analysis showed that all controls and patients were in equilibrium except for rs6152 (*AR* gene is in X chromosome). LD analysis showed a strong linkage between rs743572, rs6162 and rs6163, all of them in *CYP17A1* gene (S3 Table).

Case-control study

Firstly, analysis was conducted as a case/control study, but none of the selected SNPs showed significant differences between PCa-confirmed patients and controls (data not shown). Genotyping and allelic distribution in this cohort is shown in Table 2.

Case-case study

Analysis of clinical variables. Secondly, we focused the analysis in PCa-confirmed patient population. We found statistically significant data in relation to PSA values (4–10ng/ml; 10–20ng/ml and >20 ng/ml) in several SNPs of the *CYP17A1* gene, such as rs743572 ($p = 0.003$); rs6162 ($p = 0.015$) and rs6163 ($p = 0.010$). Furthermore, we observed that the presence of *A* allele in rs743572 ($p = 0.032$; OR = 3.017, 95% CI (1.102–8.260)); and the presence of *G* allele in rs6162 ($p = 0.036$; OR = 3.129; 95% CI (1.076–9.103)) presented an increased risk of PSA values above 10 ng/ml versus *GG* and *AA* homozygous individuals, respectively. Concerning to Gleason score, we did not find any marker with statistically significant value, though rs1256049 in *ESR2* gene was close to significance ($p = 0.076$) (S1 Fig). Regarding T stage, CT patients for rs2293275 in *LHCGR* gene were associated with more advanced stages, T3 and 4 ($p = 0.037$). See details in Tables 3 and 4.

We found statistical associations between D'Amico risk classification and the following SNPs in the *CYP17A1* gene: rs743572 ($p = 0.008$), rs6162 ($p = 0.019$), rs6163 ($p = 0.015$), and rs1256049 ($p = 0.029$) (Table 3). Moreover *G* allele presence in rs743572 confers an increased risk of being in intermediate and high risk stratification versus *AA* patients ($p = 0.016$; OR = 3.856; 95% CI (1.281–11.603)). The presence of *A* allele in rs6162 confers an increased risk of being in intermediate and high risk stratification versus *GG* ($p = 0.032$; OR = 3.574; 95% CI (1.117–11.439)); and in rs6163 *A* allele confers an increased risk of being in intermediate and high risk stratification versus *CC* ($p = 0.019$; OR = 3.866; 95% CI (1.248–11.981)) (Table 4).

Analysis of biochemical recurrence. A total of 148 patients were included in the biochemical recurrence analysis after initiation of primary treatment. Of them, 32 (21.6%) received ADT (androgen deprivation therapy); 73 (49.3%) and 38 (25.7%) patients underwent radiotherapy and radical prostatectomy, respectively, and only 5 patients (3.4%) remained in active surveillance. In general, within 54 months of observation after treatment, 123 (83.1%) patients did not show significant increases in PSA levels and 25 (16.9%) of them presented a biochemical recurrence.

After stratifying by the type of therapy received, we observed that the rate of biochemical recurrence was 31.3% for patients treated with ADT, 6.8% for those treated with radiotherapy

Table 2. Genotyping and Allelic Proportion of SNPs.

SNP		n			Allelic Proportion	
		<u>A</u>		<u>G</u>	<u>A</u>	<u>G</u>
rs6152 (<i>AR</i>)	PCa	29	-	127	0.19	0.81
	Control	25	-	130	0.16	0.84
rs9332969 (<i>AR</i>)	PCa	-	-	156	0.00	1.00
	Control	-	-	155	0.00	1.00
rs743572 (<i>CYP17A1</i>)	PCa	<u>AA</u>	<u>AG</u>	<u>GG</u>	<u>A</u>	<u>G</u>
	Control	67	66	23	0.64	0.36
rs6162 (<i>CYP17A1</i>)	PCa	53	82	20	0.61	0.39
	Control	21	84	50	0.41	0.59
rs6163 (<i>CYP17A1</i>)	PCa	<u>AA</u>	<u>AC</u>	<u>CC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
	Control	22	71	63	0.37	0.63
rs1004467 (<i>CYP17A1</i>)	PCa	19	81	55	0.38	0.62
	Control	127	28	1	0.9	0.1
rs2293275 (<i>LHCGR</i>)	PCa	114	39	2	0.86	0.14
	Control	63	78	15	0.65	0.35
rs1062577 (<i>ESR1</i>)	PCa	<u>CC</u>	<u>CT</u>	<u>TT</u>	<u>C</u>	<u>T</u>
	Control	63	73	19	0.64	0.36
rs1256049 (<i>ESR2</i>)	PCa	<u>AA</u>	<u>AT</u>	<u>TT</u>	<u>A</u>	<u>T</u>
	Control	4	36	118	0.13	0.87
rs1256049 (<i>ESR2</i>)	PCa	<u>CC</u>	<u>CT</u>	<u>TT</u> **	<u>C</u>	<u>T</u>
	Control	139	17	-	0.95	0.05
	Control	141	14	-	0.95	0.05

* Men are hemizygous for rs6152 and rs9332969, because these SNP are in *AR* gene which is located on X chromosome.

** There are not *TT* carriers in the Iberian population. p-values are not included due to none of them reach significant values.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447.t002>

and 26.3% for patients undergoing radical prostatectomy. None of the patients who remained in active surveillance manifested biochemical recurrence.

As SNPs rs743572, rs6162 and rs6163 showed an increased risk of D'Amico risk, we performed a Kaplan Meier analysis and log-rank test for ADT, radiotherapy and radical prostatectomy therapies. For ADT as well as for radiotherapy, none of the SNPs were significantly associated to BRFs. However, for radical prostatectomy *AC* and *AA* genotypes in rs6163 (*CYP17A1*) were significantly associated with a shorter BRFs compared to the *CC* genotype (log-rank $p = 0.039$), 29.10 months vs 49.59 months, respectively (Fig 1). When a Cox regression multivariable analysis was performed, rs6163 was not an independent variable for risk to BRFs after radical prostatectomy ($p = 0.221$; OR = 2.822; 95% CI (0.535–14.885)).

Multigene analysis. Multigene analysis of SNPs revealed that the genotype GTGTAACA for variants rs743572, rs2293275, rs6152, rs1062577, rs6162, rs6163, rs1256049 and rs1004467 (in this order) was associated with significant increased risk according to D'Amico classification ($p = 0.0045$; OR: 0.6, 95% CI(0.19–1.02)); higher PSA values ($p = 0.0011$; OR: 0.68, 95% CI

Table 3. Significant associations between clinical variables and SNPs in PCa patients.

SNP	Genotypes	Clinical Variable			P-value*
		PSA (ng/ml)			
		4–10	10.1–20	> 20	
rs743572	AA	42	13	12	0.003
	AG	25	20	21	
	GG	17	0	6	
rs6162	AA	16	0	5	0.015
	AG	32	21	23	
	GG	36	12	11	
rs6163	AA	16	0	6	0.010
	AC	29	20	22	
	CC	39	13	11	
		T Stage			
		T1-T2	T3-T4		
rs2293275	CC	57	1		0.037
	CT	66	9		
	TT	14	0		
		D'AmicoRisk			
		Low	Intermediate	High	
rs743572	AA	33	17	15	0.008
	AG	13	28	24	
	GG	8	9	6	
rs6162	AA	8	8	5	0.019
	AG	17	32	26	
	GG	29	14	14	
rs6163	AA	8	8	6	0.015
	AC	15	30	25	
	CC	31	16	14	
rs1256049	CC	49	44	44	0.029
	CT	5	10	1	
	TT	0	0	0	

* Chi-square test.

Statistical not significant p-values not shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447.t003>

(0.35–1.31)); and increased risk of Gleason score ≥ 7 ($p = 0.026$; OR: 5.21, 95% CI (1.23–22.02)). Regarding T stage, patients with genotype GCGTAACA (rs743572, rs2293275, rs6152, rs1062577, rs6162, rs6163, rs1256049 and rs1004467, in this order) showed an increased risk of having higher T stage values such as T3 and T4 ($p = 0.045$; OR: 6.34, 95% CI (1.06–37.88)) (S4 Table).

Conversely, TAAAG genotype for SNPs rs1062577, rs6162, rs6163 and rs1004467 seem to protect from higher PSA values ($p = 0.016$; OR: - 0.43, 95% CI (-0.79–-0.08)) and ATGGCCA genotype for SNPs rs743572, rs2293275, rs6152, rs6162, rs6163, rs1256049 and rs1004467 showed a protective effect for higher Gleason scores (values ≥ 7) ($p = <0.0001$; OR: -0.38, 95% CI (-0.37–-0.40)). No genotypes were significantly associated with risk of PCa (S4 Table).

Discussion

PCa is a heterogeneous disease as evidenced by its variable clinical course [15]. PSA level, core biopsies, T stage and Gleason scores used for initial evaluation offer limited information to

Table 4. Multivariate analysis for differentially distributed SNPs and clinical variables.

Clinical Variable	n	SNP	Dominant model			Recessive model		
				OR (95% CI)	p-value		OR (95% CI)	p-value
PSA, 4 < 10 vs. > 10 < 20 + > 20	156	rs743572	AA vs. AG +GG	1.871 (0.973–3.597)	0.060	GG vs. AG +AA	3.017 (1.102–8.260)	0.032
		rs6162	GG vs. AG +AA	1.603 (0.825–3.117)	0.164	AA vs. AG +GG	3.129 (1.076–9.103)	0.036
		rs6163	CC vs. AC +AA	1.731 (0.896–3.343)	0.103	AA vs. AC +GG	2.702 (0.984–7.417)	0.054
T Stage, 1–2 vs. 3–4	147	rs2293275	CC vs. CT +TT	7.392 (0.897–60.904)	0.063	TT vs. CT +CC	NA	NA
D'Amico Risk, low vs intermediate + high	153	rs743572	AA vs. AG +GG	3.856 (1.281–11.603)	0.016	GG vs. AG +AA	0.298 (0.086–1.033)	0.056
		rs6162	GG vs. AG +AA	3.574 (1.117–11.439)	0.032	AA vs. AG +GG	2.437 (0.686–8.659)	0.168
		rs6163	CC vs. AC +AA	3.866 (1.248–11.981)	0.019	AA vs. AC +GG	0.367 (0.105–1.290)	0.118
		rs1256049	CC vs. CT +TT	1.493 (0.352–6.331)	0.586	TT vs. CT +CC	NA*	NA*

* There is not *TT* carriers for rs1256049. Statistical test: logistic regression. PSA and T Stage analyses were adjusted for age. D'Amico Risk analyses were adjusted for age, PSA level at diagnostic, Gleason Score and T Stage. vs. versus, OR odds ratio, CI confidence interval, NA not applicable. As can be seen in column 2, n values are variable due to several patients are lost during the follow up.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447.t004>

clinicians to determine diagnosis and harshness of disease [16]. Current clinical risk groups, used in clinical routine, seem to misclassify patients leading to over/undertreatment of these patients [16]. New and reliable tools are needed to improve the precision in diagnosis and stratification of PCa patients, and genetic markers could be the most suitable ones. In the last decade, development of high throughput technologies have favored the identification of genetic variations associated with PCa and their incorporation into clinical practice offers an opportunity to ease clinical decisions [17].

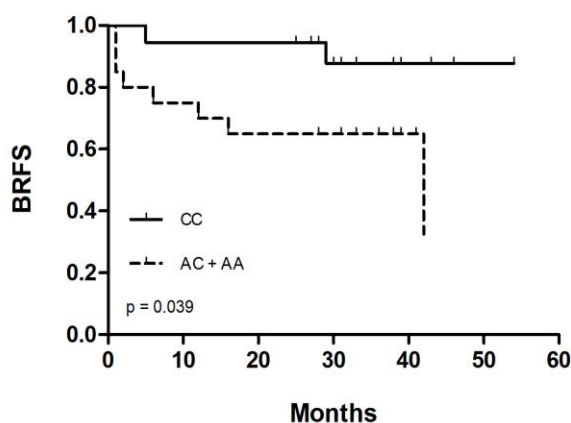


Fig 1. BRFS according rs6163 (*CYP17A1*) genotype. Kaplan-Meier curves of time to biochemical recurrence in patients treated with radical prostatectomy and stratified by rs6163 genotype (CC vs. AC+AA). P value obtained from log-rank t test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185447.g001>

There is scarce data in relation to genetic germline biomarkers for PCa prognosis and stratification. Main researches are focused on *RNASEL* (locus HPC1), *ELAC2* (locus HPC2), *MSR1* (chromosome 8) [18] and *BRCA1/2* genes [19], but no conclusive data have been reported. For instance, it is known that PCa patients harboring germline DNA repair alterations generally have a worse clinical evolution or earlier cancer events. However, little is known of a genetic stratification of the disease or even genetic responsiveness to radical prostatectomy, radiotherapy or hormonal therapies including ADT and second-generation hormonal agents (such as abiraterone and enzalutamide) [20]. PCa is a hormone-dependent cancer; the androgen receptor (*AR*) axis plays a pivotal role in both disease development and progression [21]; for this reason we focused on PCa sex hormones related genes, to perform a retrospective study for the relation among *AR*, *CYP17A1*, *LHCGR* and *ESR* polymorphisms with PCa predisposition and severity.

We could not prove any statistically significant difference between controls and patients but when the analysis was focused on PCa patients we proved these genetic markers had a predictive role on PCa aggressiveness characteristics (PSA, D'Amico risk and T stages). It is known that any change in androgen synthesis and metabolism genes can strongly affect the progression of PCa and the response to treatments [22]. Our aim is to try to discover optimal biomarkers associated to PCa aggressiveness such as recent patented genes like rs4054823 (17p12.) [23, 24].

Recent studies of NGS or Exome sequencing focused on finding new PCa biomarkers, have found that rs33999879 (SMC4) was a predictor for Gleason scores upgrade [25]. These NGS data also found that carrying any mutations at pathogenic germline variants (*ATM*, *ATR*, *BRCA2*, *FANCL*, *MSR1*, *MUTYH*, *RBI*, *TSHR* and *WRN*) were frequently observed in patients with metastatic CRPC (castration-resistant PCa) [26]. However, no data yet had analyzed the role of *AR*, *CYP17A1*, *LHCGR* and *ESR* genes in PCa.

For *CYP17A1* gene we found that several SNPs (rs743572, rs6162 and rs6163) were statistically associated with a more aggressive PCa (PSA values > 10 ng/ml and a higher D'Amico risk). *CYP17A1* gene encodes a key enzyme in the steroidogenic pathway that produces progesterone, mineralocorticoids, glucocorticoids, androgens, and estrogens, and it has a critical function in PCa [27]. There is no published data that had previously established any relationship between clinical stages and *CYP17A1* SNPs in African ancestry or Caucasian populations [28].

In silico analyses for *CYP17A1* variants have showed that rs1004467 is on intronic region, rs743572 is on 5' untranslated region; and rs6162 and rs6163, are both coding-synonymous (H46H and S65S, respectively) and with a tolerated phenotypic effect [29] (SITF score: 0.31 and 1, respectively). The presence of *CYP17A1* SNPs is further associated with altered levels of circulating DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate) in Caucasians, which likely modify steroid precursor levels available for intracrine conversion to more potent hormones in tissues and prostatic cells [7]. In addition, genetic polymorphisms in the *CYP17A1* gene have been significantly associated with a risk of progression to CRPC [30], but there are no details on risk stratification. A recent meta-analysis carried out by Wang et al, did not find any significant association between rs743572 polymorphism and PCa risk but it was suggested that *CYP17A1* rs743572 might modify the risk of PCa in the individuals of African origin [31].

In the present study only rs6163 showed a significant association with a shorter BRFs in patients with prostatectomy. There is not much data about genetic markers in androgen metabolism as indicators of outcomes after PCa therapies and scarce data in relation to *CYP17A1* gene [7, 20]. Wright et al. investigated the genetic association between three SNPs in *CYP17A1* (rs743572, rs10883783 and rs17115100) and their responses to treatment (principally prostatectomy), but they did not find any differences in the risk of recurrence/progression by this genotype analysis [32]. However SNPs in other genes such as *SRD5A* and *HSD17B*,

both involved in androgen metabolism, were shown to be associated to biochemical recurrence in Caucasian and Asian PCa patients after prostatectomy [22, 33]. rs1004467 (*CYP17A1*) was previously found to be associated with PCa risk and disease progression after ADT among Japanese population [30]. It is proved that serum dihydrotestosterone (DHT) level and testosterone was significantly elevated in GG genotype for rs1004467 (*CYP17A1*) compared to A allele carriers [34]. Studies have shown that those individuals with higher levels of DHT were susceptible to CRPC development in the future. This could provide insights for an early PCa detection, diagnosis, management and potential therapeutic targets [34]. Last, our LD analysis showed a strong linkage between rs743572, rs6162 and rs6163, (*CYP17A1*). Similar results were supported by other studies proving that both, rs6162 and rs6163 were strongly linked with rs743572, so these SNPs exhibit their functions in coordination with rs743572 as a risk genotype [30].

In relation to *ESR* genes, we demonstrated a statistical association between rs1256049 (*ESR2*) and a higher D'Amico risk. Several studies have focused on the effect of *ESR* polymorphisms (like rs9340799 and rs1256049) on PCa development, but none of them have evaluated their relation to PCa aggressiveness. rs1256049 is a silent mutation in codon 328 and G>A change has a direct effect on modifying the secondary structure of the mRNA; leading to changes in mRNA stability and translation which makes it as a candidate polymorphism for PCa susceptibility in Caucasians [35, 36]. This SNP has been previously associated to an increased PCa risk, both in codominant and recessive genetic models [35].

Despite, *ESR1* (rs1062577) was not associated with any clinical variable in the present study, it was previously related to changes in plasma steroid levels conducting cancer aggressiveness and efficacy of ADT [7]. We have proved with an *in silico* analysis that A allele (rs1062577) generates a new miRNA binding site for hsa-miR-3646, hsa-miR-3662 and hsa-miR-5585-3p [37]. In PCa there are similar expression patterns for miR-3646 and miR-3662, similarly happens in other hormonal dependant tumors like breast, ovarian or uterine [37]. For example, in breast cancer, miR-3646 produces cellular proliferation [38]. Moreover A allele in rs1062577 (*ESR1*) produces a loss of miR-186 and miR-6507-5p binding site [37]. miR-186 has a role as a PCa tumor suppressor, so any alteration on this SNP will be related to an oncological event [39].

We demonstrated in *LHCGR* gene, a relation between rs2293275 and high T stages. Other researchers had found an association between PCa incidence and this variant in different racial groups by no for stage of the disease [40]. rs2293275 produces a missense mutation with an amino acid change (N312S) [29]. Position 312 is located in exon 10 and this is important for receptor activation [40], but this amino acid change seems to not affect frameshift region so it has a tolerated phenotypic effect (SIFT score: 0.774) [29].

Finally, we did not find any significant association with PCa for *AR* SNPs (rs6152 and rs9332969). Likewise, a previous study in a Caucasian population did not find differences between case-control for rs6152 but it was described an association for this polymorphism with advances stages [41]. rs6152 is a coding-synonymous region (E213E) not frameshift alteration and with a tolerated phenotypic effect [29] (SIFT score: 1). In relation to rs9332969, despite we not report any allelic variation (100% of patients and controls are G carriers), this SNP seems to be an attractive candidate biomarker for PCa aggressiveness because is a missense variant with an amino acid change (R841H) [29]. R841H variation causes androgen insensitivity syndrome [42]. This is due because *AR* protein with R841H variation alters the interaction with androgens which result in a partial *AR* functional disruption [42] and its frequency and effect had not been previously studied in the European population [43].

We fully acknowledge that our results must be interpreted with caution, as the sample size is limited. One core limitation of the study is the low specificity of prostate biopsy; although

we tried to control this issue by performing systematic 20-core biopsies, the number of false negatives could still be high. Moreover, the observation period was relatively short (median follow-up of 34.18 month) and only one-third of the patients had a high risk of recurrence; and the number of patient in each treatment group is reduced. Nevertheless, this is the first time that the role of *AR*, *CYP17A1*, *LHCGR* and *ESR* polymorphisms have been studied in relation to PCa aggressiveness.

Conclusion

We describe the initial roles of *CYP17A1*, *AR*, *LHCGR* and *ESR* as risk disease biomarkers. We believe that rs743572, rs6162, rs6163, and rs1256049 (*CYP17A1*); and rs2293275 (*LHCGR*) are promise biomarkers for PCa aggressiveness. Future studies seem warranted in order to evaluate the real predictive and prognostic impact of *CYP17A1*, *AR*, *LHCGR* and *ESR* variations on each specific treatment response in a larger cohort of patients within longer observation periods.

Supporting information

S1 Fig. Association between rs1256049 (*ESR2*) and Gleason score.
(TIF)

S1 Table. Description of SNPs included in the study. Information was obtained from Ensembl and dbSNP data base, National Center for Biotechnology Information (NCBI).
(XLSX)

S2 Table. Primers sequence details.
(XLSX)

S3 Table. Significant linkage disequilibrium for variants. Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci performed with SNPstats software. In blue, all polymorphism that are out of balance (significance level = 0.05). p = p-value; r² = standardized disequilibrium values.
(XLSX)

S4 Table. Multigene analysis. All genotypes with a frequency less than 5% in the population have been omitted.
(XLSX)

Acknowledgments

We want to thank to Gema Garcia-Rodriguez and Manuela Expósito-Ruiz for their collaboration and all the donors and nursery that make this study possible.

This paper will be part of Inmaculada Robles's Doctoral Thesis performed in the Biomedicine Doctorate Program of the University of Granada, Spain

Author Contributions

Conceptualization: Maria Jesus Alvarez-Cubero.

Data curation: Manrique Pascual-Geler, Jose Manuel Cozar, Ignacio Puche-Sanz.

Formal analysis: Inmaculada Robles-Fernandez.

Investigation: Inmaculada Robles-Fernandez, Luis Javier Martinez-Gonzalez.

Methodology: Luis Javier Martinez-Gonzalez.

Project administration: Maria Jose Serrano, Jose Antonio Lorente.

Resources: Manrique Pascual-Geler, Jose Manuel Cozar, Ignacio Puche-Sanz.

Supervision: Maria Jose Serrano, Jose Antonio Lorente, Maria Jesus Alvarez-Cubero.

Validation: Luis Javier Martinez-Gonzalez.

Visualization: Maria Jesus Alvarez-Cubero.

Writing – original draft: Inmaculada Robles-Fernandez, Maria Jesus Alvarez-Cubero.

Writing – review & editing: Inmaculada Robles-Fernandez, Luis Javier Martinez-Gonzalez, Ignacio Puche-Sanz, Maria Jesus Alvarez-Cubero.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359–86. Epub 2014/09/16. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210> PMID: 25220842.
2. Narita S, Mitsuoka K, Tsuchiya N, Koie T, Kawamura S, Ohyama C, et al. Reassessment of the risk factors for biochemical recurrence in D'Amico intermediate-risk prostate cancer treated using radical prostatectomy. *Int J Urol*. 2015; 22(11):1029–35. Epub 2015/08/21. <https://doi.org/10.1111/iju.12898> PMID: 26290306.
3. Irshad S, Bansal M, Castillo-Martin M, Zheng T, Aytes A, Wenske S, et al. A molecular signature predictive of indolent prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2013; 5(202):202ra122. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006408> PMID: 24027026; PubMed Central PMCID: PMC3943244.
4. Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, Fraser M, Ross-Adams H, Erho N, et al. Tumour genomic and micro-environmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2014; 15(13):1521–32. [https://doi.org/10.1016/S1473-2045\(14\)71021-6](https://doi.org/10.1016/S1473-2045(14)71021-6) PMID: 25456371.
5. Ramos-Montoya A, Lamb AD, Russell R, Carroll T, Jurmeister S, Galeano-Dalmau N, et al. HES6 drives a critical AR transcriptional programme to induce castration-resistant prostate cancer through activation of an E2F1-mediated cell cycle network. *EMBO Mol Med*. 2014; 6(5):651–61. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303581> PMID: 24737870; PubMed Central PMCID: PMC3943244.
6. Stelloo S, Nevedomskaya E, van der Poel HG, de Jong J, van Leenders GJ, Jenster G, et al. Androgen receptor profiling predicts prostate cancer outcome. *EMBO Mol Med*. 2015; 7(11):1450–64. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505424> PMID: 26412853; PubMed Central PMCID: PMC3943244.
7. Lévesque É, Huang SP, Audet-Walsh É, Lacombe L, Bao BY, Fradet Y, et al. Molecular markers in key steroidogenic pathways, circulating steroid levels, and prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(3):699–709. Epub 2012/11/27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2812> PMID: 23186779.
8. Alukal JP, Lepor H. Testosterone Deficiency and the Prostate. *Urol Clin North Am*. 2016; 43(2):203–8. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.013> PMID: 27132577.
9. Lau KM, To KF. Importance of Estrogenic Signaling and Its Mediated Receptors in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(9). Epub 2016/08/31. <https://doi.org/10.3390/ijms17091434> PMID: 27589731; PubMed Central PMCID: PMC5037713.
10. Weng H, Li S, Huang JY, He ZQ, Meng XY, Cao Y, et al. Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017; 7:40554. Epub 2017/01/16. <https://doi.org/10.1038/srep40554> PMID: 28091563; PubMed Central PMCID: PMC5238402.
11. El Ezzi AA, Baker MT, Zaidan WR, Hraiki KM, El Saidi MA, Kuddus RH. Association of Polymorphisms in the VDR, CYP17 and SRD5A2 Genes and Prostate Cancer Among Lebanese Men. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017; 18(1):93–100. Epub 2017/01/01. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.93> PMID: 28240015.
12. Beuten J, Gelfond JA, Franke JL, Weldon KS, Crandall AC, Johnson-Pais TL, et al. Single and multi-genic analysis of the association between variants in 12 steroid hormone metabolism genes and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(6):1869–80. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0076> PMID: 19505920.
13. Information NCfB. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
14. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22(15):1928–9. Epub 2006/05/23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268> PMID: 16720584.

15. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Gronberg H, et al. The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol.* 2013; 64(4):567–76. Epub 2013/06/14. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.05.029> PMID: 23759327; PubMed Central PMCID: PMC4342117.
16. Colicchia M, Morlacco A, Cheville JC, Karnes RJ. Genomic tests to guide prostate cancer management following diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17(4):367–77. Epub 2017/03/13. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1302332> PMID: 28277880.
17. Helfand BT, Catalona WJ, Xu J. A genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment. *Curr Opin Urol.* 2015; 25(1):53–8. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000130> PMID: 25405931; PubMed Central PMCID: PMC4281884.
18. Alvarez-Cubero MJ, Pascual-Geler M, Martinez-Gonzalez LJ, Expósito Ruiz M, Saiz M, Cozar JM, et al. Association between RNASEL, MSR1, and ELAC2 single nucleotide polymorphisms and gene expression in prostate cancer risk. *Urol Oncol.* 2016; 34(10):431.e1–8. Epub 2016/06/16. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.05.018> PMID: 27318894.
19. Maia S, Cardoso M, Paulo P, Pinheiro M, Pinto P, Santos C, et al. The role of germline mutations in the BRCA1/2 and mismatch repair genes in men ascertained for early-onset and/or familial prostate cancer. *Fam Cancer.* 2016; 15(1):111–21. Epub 2015/08/21. <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9832-x> PMID: 26289772.
20. Van den Broeck T, Joniau S, Clinckemalie L, Helsen C, Prekovic S, Spans L, et al. The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:627510. Epub 2014/02/19. <https://doi.org/10.1155/2014/627510> PMID: 24701578; PubMed Central PMCID: PMC3950427.
21. Fujimoto N, Shiota M, Tomisaki I, Minato A. Gene Polymorphism-related Individual and Interracial Differences in the Outcomes of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2017; 15(3):337–42. Epub 2017/02/12. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.01.006> PMID: 28188049.
22. Audet-Walsh É, Bellemare J, Lacombe L, Fradet Y, Fradet V, Douville P, et al. The impact of germline genetic variations in hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenases on prostate cancer outcomes after prostatectomy. *Eur Urol.* 2012; 62(1):88–96. Epub 2011/12/21. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.12.021> PMID: 22209174.
23. Xu J, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Wiklund F, Sun J, et al. Inherited genetic variant predisposes to aggressive but not indolent prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(5):2136–40. Epub 2010/01/19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914061107> PMID: 20080650; PubMed Central PMCID: PMC2836698.
24. Xu J, Isaacs WB, Grönberg H. Methods and compositions for correlating genetic markers with risk of aggressive prostate cancer. Google Patents; 2017.
25. Oh JJ, Park S, Lee SE, Hong SK, Lee S, Choe G, et al. The use of exome genotyping to predict pathological Gleason score upgrade after radical prostatectomy in low-risk prostate cancer patients. *PLoS One.* 2014; 9(8):e104146. Epub 2014/08/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104146> PMID: 25093842; PubMed Central PMCID: PMC4122442.
26. Hart SN, Ellingson MS, Schahl K, Vedell PT, Carlson RE, Sinnwell JP, et al. Determining the frequency of pathogenic germline variants from exome sequencing in patients with castrate-resistant prostate cancer. *BMJ Open.* 2016; 6(4):e010332. Epub 2016/04/17. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010332> PMID: 27084275; PubMed Central PMCID: PMC4838679.
27. Udhane SS, Dick B, Hu Q, Hartmann RW, Pandey AV. Specificity of anti-prostate cancer CYP17A1 inhibitors on androgen biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 477(4):1005–10. Epub 2016/07/06. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.019> PMID: 27395338.
28. Brureau L, Moningo D, Emeville E, Ferdinand S, Punga A, Lufuma S, et al. Polymorphisms of Estrogen Metabolism-Related Genes and Prostate Cancer Risk in Two Populations of African Ancestry. *PLoS One.* 2016; 11(4):e0153609. Epub 2016/04/13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153609> PMID: 27074016; PubMed Central PMCID: PMC4830606.
29. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Web Server issue):W452–7. Epub 2012/06/11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539> PMID: 22689647; PubMed Central PMCID: PMC3394338.
30. Yamada T, Nakayama M, Shimizu T, Nonen S, Nakai Y, Nishimura K, et al. Genetic polymorphisms of CYP17A1 in steroidogenesis pathway are associated with risk of progression to castration-resistant prostate cancer in Japanese men receiving androgen deprivation therapy. *Int J Clin Oncol.* 2013; 18(4):711–7. Epub 2012/06/21. <https://doi.org/10.1007/s10147-012-0430-8> PMID: 22714708.
31. Wang Y, Zhang Y, Meng H, Hou X, Li Z, Liu Q, et al. Quantitative assessment of the association between CYP17 rs743572 polymorphism and prostate cancer risk. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 71(2):983–91. Epub 2014/10/18. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0297-6> PMID: 25323563.

PUBLICACIONES ADICIONALES OBTENIDAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M; **Robles-Fernandez I**, Cozar JM, Lorente JA; Alvarez-Cubero MJ. **Improving the genetic signature of prostate cancer, the somatic mutations**. Urol Oncol 2018. Apr 9. pii: S1078-1439(18)30088-7.

Cozar JM, **Robles-Fernandez I**, Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M, Rodriguez-Martinez A, Serrano MJ, Lorente JA, Alvarez-Cubero MJ. **Genetic markers a landscape in prostate cancer**. Mutat Res. 2018 Jan - Mar;775:1-10. Review.

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. **A comprehensive study of circulating tumour cells at the moment of prostate cancer diagnosis: biological and clinical implications of EGFR, AR and SNPs**. Oncotarget. 2017 Jul 31;8(41):70472-70480.

Pascual-Geler M, Urquiza-Salvat N, Cozar JM, **Robles-Fernandez I**, Rivas A, Martinez-Gonzalez LJ, Ocaña-Peinado FM, Lorente JA, Alvarez-Cubero MJ. **The influence of nutritional factors on prostate cancer incidence and aggressiveness**. Aging Male. 2017 Sep 20:1-9.

Alvarez Cubero MJ, Lorente JA, **Robles-Fernandez I**, Rodriguez-Martinez A, Puche JL, Serrano MJ. **Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection**. Methods Mol Biol. 2017;1634:283-303. Capítulo de libro.

Serrano MJ, Alvarez-Cubero MJ, De Miguel Pérez D, Rodríguez-Martínez A, Gonzalez-Herrera L, **Robles-Fernandez I**, Hernandez JE, Puche JLG, Lorente JA. **Significance of EGFR Expression in Circulating Tumor Cells**. Adv Exp Med Biol. 2017;994:285-296. Capítulo de libro.

Alvarez-Cubero MJ, Martinez-Gonzalez LJ, **Robles-Fernandez I**, Martinez-Herrera J, Garcia-Rodriguez G, Pascual-Geler M, Cozar JM, Lorente JA. **Somatic Mutations in Prostate Cancer: Closer to Personalized Medicine**. Mol Diagn Ther. 2017 Apr;21(2):167-178. Review.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Rodríguez-Martínez A, Puche-Sanz I, **Robles-Fernández I**, Garrido-Navas C, Cózar-Olmo JM, Lorente JA, Serrano MJ. Protocol optimization for mass cytometry analysis of circulating tumor cells subpopulations. *11th International Symposium on Minimal Residual Cancer*. 3-5 de Mayo, 2018. Montpellier. Francia. **Poster**.

De la Torre-Trillo J, Puche-Sanz I, **Robles-Fernández, I**, Martínez, LJ, Lorente, JA, Cózar-Olmo, JM, Pascual-Geler, M, Álvarez-Cubero, MJ. Somatic mutations and aggressiveness of prostate cancer at the moment of prostate diagnosis. *37th Congress of Société Internationale d'Urologie (SIU)*. 19-22 de Octubre, 2017. Lisboa, Portugal. **Poster**.

De la Torre-Trillo, J, Puche-Sanz, I, **Robles-Fernández, I**, Pascual-Geler, M, Lorente, JA, Martínez, LJ, Canales Casco, N, Cózar-Olmo, JM, Álvarez-Cubero, MJ. *XXXVI Congreso de la Confederación Americana de Urología (CAU)*. 17-21 de Octubre, 2017. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. **Poster**.

De la Torre-Trillo J, Puche-Sanz I, **Robles-Fernández I**, Pascual-Geler M, Canales-Casco N, Lorente JA, Cozar-Olmo JM, Álvarez-Cubero MJ. Análisis de la relación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), expresión génica (RNAm) y riesgo clínico en el cáncer de próstata al momento del diagnóstico. *XXX Congreso de la Asociación Andaluza de Urología*. 5-6 de Octubre, 2017. Granada, España. **Poster**.

De la Torre-Trillo J, **Robles-Fernández I**, Puche-Sanz I, Pascual-Geler M, Canales-Cascos N, Lorente JA, Cozar-Olmo JM, Alvarez-Cubero MJ. Variantes genéticas como marcadores pronósticos al momento diagnóstico del cáncer de próstata. *LXXXII Congreso Nacional de Urología*. 7-10 de Octubre, 2017. Sevilla, España. **Poster**.

Puche-Sanz I, **Robles-Fernández I**, Pascual-Geler M, Martinez-Gonzalez LJ, Lorente JA, Cozar JM, Álvarez-Cubero MJ. Association between single nucleotide polymorphisms, gene expression and prostate cancer risk at the moment of diagnosis. *32nd Annual EAU Congress*. 24-28 de Marzo, 2017. Londres, Reino Unido. **Comunicación oral**. Publicación en *European Urology Supplements* (DOI: [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(17\)30412-8](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(17)30412-8)).

Álvarez-Cubero MJ, **Robles-Fernández I**, Lorente JA, Puche-Sanz I, Pascual-Geler M, Cozar JM, Serrano MJ. Analysis of the role of several snps in prostate cancer management. *International Symposium of Precision Medicine Based on Liquid Biopsies "from detection to dissection"*. 15-16 de Septiembre, 2016. Granada, España. **Poster**.