



ugr

Universidad
de Granada

Programa de Doctorado en Biomedicina

Investigación traslacional y medicina personalizada

ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA EN TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

VICTOR SANCHEZ CONDE

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

Directores de tesis:

María Jesús Álvarez Cubero

Fernando Vázquez Alonso



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



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Víctor Sánchez Conde
ISBN: 978-84-1117-301-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74612>

Índice

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	10
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN	
<u>Clínica del Cáncer de próstata</u>	
1. Epidemiología del cáncer de próstata.....	15
1.1 Historia natural	16
2. Cribado	17
3. Diagnóstico.....	18
3.1 PSA.....	18
3.2. Biopsia prostática	19
3.3. Resonancia Magnética multiparamétrica.....	19
3.4 Tomografía Computarizada.....	20
3.5. Gammagrafía ósea	21
3.6. PET/TC Colina	21
3.7. PET/TC marcado con antígeno prostático específico.....	21
4. Estadificación	22
4.1. Escala de Gleason.....	22
4.2. Estadificación TNM	23
4.3. Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología.....	25
4.4. Evaluación de esperanza de vida y estado de salud.....	25

5. Tratamiento del cáncer de próstata.....	28
5.1 Tratamiento diferido.....	28
5.1.1. Vigilancia activa.....	29
5.1.2. Espera vigilante.....	30
5.2. Prostatectomía Radical.....	31
5.2.1. Linfadenectomía pélvica.....	31
5.3. Radioterapia de haz externo.....	31
5.4. Braquiterapia.....	32
5.5. Terapia hormonal.....	32
5.5.1. Análogos LHRH.....	33
5.5.2. Antagonistas LHRH.....	33
5.5.3. Antiandrógenos.....	34
5.5.4. Indicaciones del tratamiento hormonal.....	34
5.5.5 Tratamientos hormonales de reciente aparición.....	34
5.6. Tratamiento del cáncer de próstata metastásico.....	35
5.6.1. Deprivación androgénica en combinación con quimioterapia.....	36
5.6.2. Deprivación androgénica en combinación con otros tratamientos hormonales.....	36
5.6.3. Deprivación androgénica en combinación con radioterapia.....	37
5.7. Tratamiento del Cáncer de Próstata Resistente a Castración.....	37
5.7.1. Tratamiento de CPRC no metastásico.....	37
5.7.2. Tratamiento de CPRC metastásico.....	38

Carcinogénesis del cáncer de próstata

1. Modelo estocástico o de evolución clonal.....	41
2. Modelo de la célula madre cancerígena.....	42
3. Epigenética en cáncer de próstata.....	44
4. Heterogeneidad en la expresión genética en cáncer de próstata.....	45

5. Inflamación prostática como vía de carcinogénesis	47
6. Lesiones premalignas y cáncer de próstata.....	48
7. Mutaciones conductoras y pasajeras en carcinogénesis	48
7.1 Alteraciones genéticas y epigenéticas en cáncer de próstata.....	50
8. El papel de los andrógenos en el inicio del cáncer de próstata.....	51
9. Reparación de DNA y defectos en la respuesta al DNA dañado.....	52

Marcadores genéticos de cáncer de próstata

mRNAs

1. miRNAs y cáncer	54
2. Participación de miRNAs en la carcinogénesis del cáncer de próstata	55
3. Selección de miRNAs como biomarcadores	58
3.1 miR-375 y miR-141	60
3.2 Controles endógenos para estudio de miRNAs en CP.....	61

SNPs

1. SNPs en el cáncer de próstata.....	62
2. Selección de SNPs como biomarcadores	64
2.1 IGF2.....	64
2.2 CYP27B1.....	65
2.3 GSTM5	66
3. SNPs en genes de la síntesis y metabolismo de esteroides sexuales.....	66
3.1 LHCGR.....	67
3.2 CYP17A1	67
3.3 Receptor androgénico.....	69
3.4. ESR1 y ESR2	70

Aplicación de bioinformática en la búsqueda de marcadores genéticos

1. The Cancer Genome Atlas.....	71
---------------------------------	----

OBJETIVOS

Objetivo principal.....	73
Objetivos secundarios.....	73

MATERIALES

1. Sangre periférica.....	76
2. Células epiteliales bucales	76
3. Tejido fresco	76

METODOLOGÍA

1. Análisis Bioinformático.....	78
1.1 TCGA de adenocarcinoma prostático.....	78
1.2 Grupos de estudio TCGA	78
1.3 Análisis de expresión diferencial	79
1.4. Análisis in silico	79
2. Análisis molecular	80
2.1 Extracción DNA	80
2.2 Genotipado a través de sondas TaqMan®	81
2.3 Validación de genotipado a través de la secuenciación	83
2.4 Extracción miRNAs.....	84
2.5 Retrotranscripción	84
2.6 Amplificación por qPCR	84
2.7 Control endógeno	85
2.8 Análisis estadístico de los resultados	85

RESULTADOS

Asociación de SNPs con variables clínicas en pacientes con adenocarcinoma prostático

1. Análisis TCGA	88
1.1 Análisis de expresión génica.....	88
1.2 Análisis funcional	90

1.3 Mutaciones somáticas TCGA.....	91
2. Análisis molecular	92
2.1 Selección de los SNPs de IGF2	93
2.2 Análisis de desequilibrio de ligandos	94
2.3 Asociaciones del genotipo rs1004446 de IGF2.....	94
2.4 Análisis de expresión génica a través de qPCR.....	94
<u>Asociación de miRNAs con variables clínicas en pacientes con adenocarcinoma prostático</u>	
1. Selección de miRNAs.....	96
2. Análisis bioinformático	96
2.1.- TCGA del CP	96
2.2 Análisis de expresión diferencial.....	99
3. Análisis molecular	102
3.1.-Análisis miR-93-5p	106
3.2.-Análisis in Silico de miRNAs	107
DISCUSIÓN	
Sobre la implicación de IGF2 en el cáncer de próstata.....	110
Sobre el uso de miRNAs como biomarcadores.....	114
CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	119

Producción científica

Los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en la revista *Biomedicines* indexada en *Journal Citation Reports* en la categoría de *Biochemistry & molecular biology* en la posición 65 de 295 según su ranking en el área, situada en un cuartil 1 (IF:6.081, año 2020). Se adjunta a continuación la cita:

Martínez-González LJ, Sánchez-Conde V, González-Cabezuelo JM, Antunez-Rodríguez A, Andrés-León E, Robles-Fernandez I, Lorente JA, Vázquez-Alonso F, Alvarez-Cubero MJ. Identification of MicroRNAs as Viable Aggressiveness Biomarkers for Prostate Cancer. *Biomedicines*. 2021 Jun 5;9(6):646. DOI: 10.3390/biomedicines9060646. PMID: 34198846; PMCID: PMC8227559.

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es el tumor más frecuentemente diagnosticado en población masculina y supone el 5º motivo de muerte por cáncer en hombres encontrando un aumento en su incidencia.

En el diagnóstico de CP el PSA es la herramienta fundamental utilizada en el cribado, aunque en ocasiones resulta insuficiente e inexacta. El CP es una enfermedad biológica y clínicamente heterogénea que presenta distintos grados de agresividad. Las variantes clínicas utilizadas actualmente como son el estadiaje TNM, la agresividad histológica o el propio PSA son insuficientes para predecir la agresividad del tumor y no existe ningún marcador que pueda predecir la respuesta a tratamiento. Todo esto provoca sobrediagnóstico y sobretratamiento de adenocarcinomas de baja agresividad que suponen efectos adversos y sobrecostes para los pacientes.

Además, en otros tumores la biopsia del tejido tumoral ya sea primario o de las metástasis, permiten conocer biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta tumoral. En el CP el lugar más frecuente de localización de las metástasis es óseo. Este hecho implica una dificultad para obtener muestras biológicas de análisis molecular, lo que convierte al CP un tumor donde el análisis de otras fuentes celulares se presenta como imprescindible para el desarrollo de su investigación.

Actualmente uno de los retos en la investigación en CP es permitir la mejora de su diagnóstico y tratamiento, que pasa necesariamente por una mejora en la precisión de la detección en estadio precoz y definir un nuevo estadiaje que prediga el transcurso de la patología y la respuesta a los tratamientos.

El desarrollo de técnicas de análisis genético permite la caracterización de variantes genéticas frecuentes en el DNA que se relacionan con predisposición al CP y la agresividad. De la misma forma, los miRNAs juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión genética y su alteración en CP. La expresión de miRNAs puede reflejar el estado evolutivo del tumor y su progresión, por lo que pueden ser biomarcadores de utilidad en el CP.

Al gran desarrollo de las técnicas de análisis genético se suma la utilización de la informática como una herramienta más para la búsqueda de biomarcadores. La secuenciación completa del genoma y su relativamente reducido bajo coste ha supuesto la creación de grandes bases de datos genéticas que son de gran utilidad para investigadores. Dichas bases de datos pueden ser utilizadas de forma remota para realizar estudios preliminares que orienten estudios experimentales, pero también pueden reforzar conclusiones halladas en los estudios.

Por ello el estudio de variantes génicas, expresión de miRNA combinado con bioinformática puede llevar a la mejora en el diagnóstico, pronóstico y previsión en el CP. Aunque los datos de los estudios actuales muestran datos insuficientes, por lo que la utilización de biomarcadores genéticos en la práctica clínica diaria se ve dificultada. Es necesario realizar mayor número de estudios para afianzar su rol en el CP.

El objetivo de esta tesis es encontrar variantes genéticas y alteraciones de expresión de miRNAs que puedan utilizarse como biomarcadores. Para lograr el objetivo se comenzó con un análisis bioinformático en TCGA buscando en la base de datos de adenocarcinoma prostático aquellos genes o miRNAs más susceptibles de presentarse alterados en pacientes con CP. Una vez realizado se añadieron variantes y miRNAs que presentaban importancia en los resultados de otros estudios publicados hasta la fecha. Todo ello concluyó en un estudio molecular en el que se eligió el gen IGF2 analizando los SNPs rs1004446, rs758164144, rs3842753 y rs3741211; y posteriormente comparando patrones de expresión. Los miRNAs elegidos para su análisis son miR-93-5p, miR-210-3p, miR-592, miR-23c, miR-141, miR-375, miR-130b y miR-200-c.

Para realizar el análisis experimental se recogieron 200 muestras de sangre, 136 hisopos con células bucales y 92 de tejido prostático. Se seleccionaron pacientes que presentaban criterios para la realización de biopsia prostática con PSA por encima de 4ng/ml. Además, se analizó un subgrupo para evaluar la respuesta a tratamiento hormonal: pacientes en fase de CPRC y aquellos con respuesta a tratamiento hormonal mantenida más de 3 años.

Se concluyó que, tanto en el estudio bioinformático como en el experimental, la expresión de IGF2 puede suponer un biomarcador de agresividad al relacionarse con la puntuación Gleason, pero también puede tratarse como un biomarcador de respuesta al tratamiento hormonal. Además, la variante germinal rs1004446 podría estar relacionada con la agresividad y respuesta a terapia hormonal en el estudio bioinformático, pero es necesaria

más investigación para confirmar su utilidad. De la misma forma las variantes rs758164144 y rs3842753 también pueden tener un papel como marcador de agresividad según el estudio bioinformático.

En el estudio de expresión de miRNAs destaca el importante valor de miR-93-5p como marcador no invasivo de cribado y agresividad en CP con unos resultados en este estudio muy prometedores confirmados tanto de forma bioinformática como por el estudio molecular.

También se han obtenido resultados sólidos tanto bioinformáticos como experimentales en el uso de miR-210-3p como biomarcador de agresividad.

Otro hallazgo prometedor es el uso de miR-592 como biomarcador no invasivo de agresividad, pero también de seguimiento tras tratamiento, no obstante, es necesario ampliar el estudio para consolidar su papel.

Por otro lado, se desestimó la utilidad de miR-141, miR-375 y miR-130b que habían sido señalados como potenciales biomarcadores en este tumor por publicaciones anteriores; y que pierden toda su fuerza en este estudio.

Abstract

Prostate cancer (PC) is the most commonly diagnosed tumour in the male population and is the 5th leading cause of tumour death in men and its incidence is going up.

PSA is still the main tool used in PC screening, although sometimes PSA is insufficient and inaccurate. PC is a biologically and clinically heterogeneous disease with different aggressiveness degrees. Clinical variants currently used, such as TNM staging, histological aggressiveness or PSA, are insufficient to predict the aggressiveness of the tumour and there aren't markers that can predict treatment response. This leads to less aggressive tumours overdiagnosis and overtreatment, which produces side effects and cost overruns for patients.

In addition, the biopsy of tumour tissue, whether primary or metastatic, allows us to identify prognostic and treatment response biomarkers in other tumours but the most frequent PC metastasis site is bone. This fact makes obtaining biological samples for molecular analysis difficult. Furthermore, other cellular sources analysis is essential for PC research.

Improve PC diagnosis and treatment is one of the current challenges in PC research which necessarily involves improving the early-stage detection accuracy and also defining a new staging system that predicts the disease course and treatment response.

Genetic analysis techniques development has made possible identifying frequent genetic variants in DNA related to susceptibility to PC and aggressiveness. Also, miRNAs play a key role in the gene expression and its alteration in PC. miRNAs expression patterns may be related to the tumour differentiation status and they may play a role as useful biomarkers in PC.

The use of informatics as another biomarker research tool has been added to the great development of genetic analysis techniques. The low cost of genome complete sequencing has led to the creation of large genetic databases that are greatly useful to researchers. These databases are used remotely to perform preliminary studies to guide experimental studies but can also reinforce conclusions.

Therefore, the study of gene variants, miRNA expression combined with bioinformatics can lead to improved diagnostic, prognostic and predictive accuracy in PC. However, current studies results yield insufficient data, making difficult daily clinical practice incorporation of genetic biomarkers. More studies are needed to establish their role in PC.

Finding genetic variants and expression alterations of miRNAs that can be used as biomarkers are the aim of this PhD. To achieve this objective, we started with a bioinformatic analysis in TCGA searching in the prostatic adenocarcinoma database for those genes or miRNAs most likely to be altered in patients with PC. Once this was done, variants and miRNAs that obtained important results in other studies published were added. All this concluded in a molecular study in which the IGF2 gene was chosen. IGF2 expression and its variants rs1004446, rs758164144, rs3842753 and rs3741211 were analysed. miR-93-5p, miR-210-3p, miR-592, miR-23c, miR-141, miR-375, miR-130b and miR-200-c were chosen for analysis.

200 blood samples, 136 buccal cell swabs and 92 prostate tissue samples were collected in order to perform the experimental analysis. Patients presenting criteria for prostate biopsy with PSA above 4ng/ml were selected, and a subgroup was also analysed to evaluate the response to hormonal treatment: patients in the CRPC stage and those with a more than 3 years response to hormonal treatment were chosen.

It was concluded both in the bioinformatic and experimental study that IGF2 expression may be a aggressiveness biomarker when related to the Gleason score, but it can also be used as a response to hormone treatment biomarker. In addition, the germline rs1004446 variant could be related to aggressiveness and hormonal therapy response in the bioinformatics analysis but more research is needed to usefulness confirm. In the same way, the rs758164144 and rs3842753 variants may also have a role as a aggressiveness marker according to the bioinformatics study.

The most important PC screening and aggressiveness non-invasive biomarker in the study of miRNA expression was miR-93-5p. miR-93-5p shows very promising results in this PhD both in bioinformatical and molecular analysis.

Solid results have also been obtained both bioinformatically and experimentally in the use of miR-210-3p as an aggressiveness biomarker.

The use of miR-592 as an aggressiveness or follow-up after treatment and non-invasive biomarker is another promising finding. However, it is necessary to extend the study to consolidate its role. On the other hand, the PC biomarker usefulness of miR-141, miR-375 and miR-130b showed in other studies lose all strength in this PhD.

Listado de abreviaturas

AKT	Gen de la serina/treonina quinasa
ATM	Gen de ataxia telangiectasia mutado
BRCA	Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama
CM	Célula Madre
CMC	Célula Madre Cancerígena
CP	Cáncer de próstata
CPRC	Cáncer de próstata Resistente a Castración
Ct	Ciclo umbral mínimo
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
ED	Expresión diferencial
EMA	Expresión Monoalélica Aleatoria
EMT	Transición epitelio mesenquimal
EZH2	Histona-lisina metil transferasa
FDR	Procedimiento de falsos descubrimientos de Benjamini-Hochberg
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HBP	Hiperplasia Benigna de Próstata
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGF2	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
IGF2BP2	Proteína de unión de mRNA a IGF2
IL	Interleucina
IMP3	Proteína 3 de unión al mRNA de IGF2
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
ITU	Infección del Tracto Urinario
JNK	Vía c-Jun N-terminal quinasa
KDR	Receptor del Dominio de Kinasa insertada
LHRH	Hormona Liberadora de la Gonadotropina
MAP3K2	proteína quiasa quinasa quinasa 2 mitogénica activada
miRNAs	Micro RNAs

MMP2	Metaloproteinasa-2
NRP2	Neuropilin-2
OR	Odds Ratio
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PIN	Neoplasia intraepitelial
PIRADS	Prostate Imaging and Reporting and Data System
PSA	Antígeno Prostático Específico
PTEN	Gen homólogo de la fosfatasa y tensina
qPCR	Reacción de la polimerasa a tiempo real
RA	Receptor Androgénico
RGN	Gen Regucalcin
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RTU	Resección Transuretral
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
SSTR2	Receptor de la somatostatina 2
TC	Tomografía Computarizada
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TDA	Terapia de Deprivación Androgénica

Introducción

Clínica del Cáncer de Próstata

1. Epidemiología del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CP) supone el segundo tumor más diagnosticado en la población masculina por detrás del carcinoma de pulmón, estos datos se muestran en la Figura 1; aunque alcanza el primer puesto en países desarrollados. En 2018 se diagnosticaron 1,1 millones de casos alrededor del mundo, suponiendo el 13.5% de los tumores descubiertos en hombres. Supone la 5ª causa de muerte por cáncer en varones. No existen grandes diferencias en la mortalidad entre los diferentes países. Presenta su máxima mortalidad en Asia y Europa y la mínima en Oceanía (1,2).

Se han realizado estudios de la prevalencia en autopsias que han concluido que en menores de 30 años no llega al 5% aumentando su Odds Ratio (OR) 1.7 por década, llegando a una prevalencia de 59% (48%-71%) en edades por encima de 79 años (2).

La incidencia del CP varía en función de la zona geográfica en la que nos encontremos, alcanzando sus mayores valores en Australia y América del norte; seguido por la zona norte y oeste de Europa. Este hecho está en relación al uso de PSA, tacto rectal y la mayor edad de la población (3).

En España se realizó en 2010 el Registro nacional de CP y se calculó una tasa estimada de nuevos casos de 82.27 por cada 100.000 hombres. La edad media de diagnóstico fue de 69 con un 14.6% de los pacientes por debajo de los 60 años. El 41% de los pacientes se encontraba entre los 60 y 70 años, el 20.3% estaba entre los 70 y 75 y el 23.1% estaba por encima de los 75 años. (4). La prevalencia del CP aumenta por cada década de edad (2).

Se catalogaron los síntomas en dicho registro apareciendo un 39.5% síntomas del tracto urinario inferior. En un 34.5% de los pacientes se vio afectado el tacto rectal previo al diagnóstico. En un 98.7% el diagnóstico fue realizado por biopsia prostática y en el resto como hallazgo incidental en los tejidos provenientes de resección transuretral, adenomectomía o cistectomía radical.

El 56.5% de los hombres presentaron una puntuación Gleason menor o igual a 6, el 26.7% igual a 7 y el 16.8% una puntuación por encima de 7.

El nivel de PSA fue evaluado y en el 62.9% de los casos era igual o inferior a 10 ng/ml y el 36.2% superaba 10 ng/ml. Un 37.5% de los hombres presentaron un tumor de bajo riesgo, un 23.1% de riesgo intermedio y el 28.6% de alto riesgo (4).

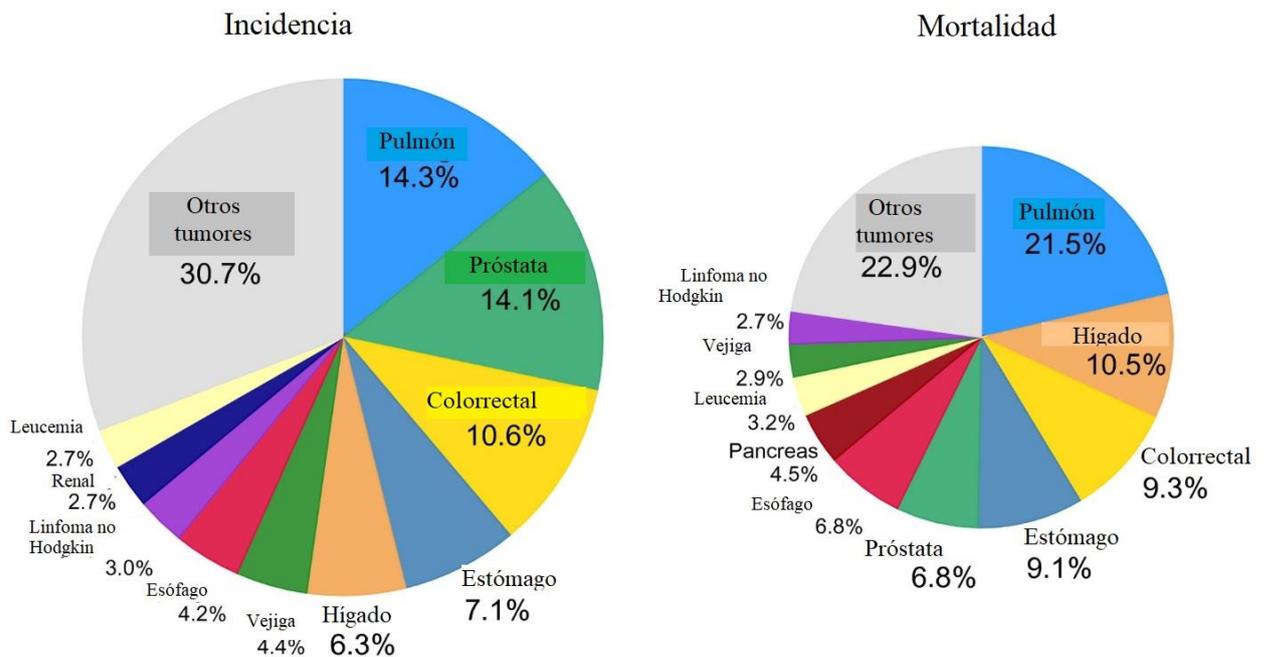


Figura 1: Incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en el mundo. (Sung H et al. Cancer Journal for Clinicians. 2021)

1.1 Historia natural

En los últimos años el CP está viviendo un cambio en su historia natural. La supervivencia a 5 años del CP en todos sus estadios pasó del 83% en los años 80 al 99% en los últimos años. Este cambio se debe en primer lugar al sobrediagnóstico que genera el cribado con PSA y tacto rectal. El 90% los diagnósticos se realizaron en estadios localizados, en los cuales la supervivencia específica a los 5 años roza el 100%. Mientras tanto la supervivencia en caso de enfermedad a distancia baja al 30% (5).

2. Cribado

El cribado es definido como la evaluación sistemática de la población asintomática que se encuentra en riesgo de padecer una enfermedad, en este caso CP. El objetivo de este cribado es impedir la letalidad del CP y aumento de la calidad de vida.

El cribado del CP basado en el tacto rectal y las cifras de antígeno prostático específico (PSA) ha sido muy controvertido desde los primeros análisis realizados. En un inicio se asoció con una escasa mejora de la supervivencia con una alta frecuencia de sobrediagnóstico y sobretratamiento.

Un estudio aleatorizado llamado *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) compara la supervivencia de individuos a los que se le realiza el cribado frente aquellos que no. Este estudio ha ido actualizando los datos desde su inicio. La última actualización en 2019 presenta un seguimiento a 16 años en el que se ha visto una reducción del riesgo relativo de muerte cáncer específica de 0.8 en el grupo de cribado. La reducción absoluta del riesgo ascendió a 0.18% en 16 años de seguimiento frente al 0.14 de los 13 años. El número necesario de personas a cribar para evitar una defunción cáncer específica fue de 570 y el número de diagnósticos necesarios para evitar una muerte fue de 18. Este número mejora los datos que presenta el cribado de cáncer de mama. Con el aumento de años de seguimiento se está viendo que la tendencia es igualar los diagnósticos en el grupo de cribado frente al control, sin embargo, sigue apareciendo un 41% más de diagnósticos en el grupo de cribado. Se ha visto que para diagnosticar 5000 cáncer se necesitan realizar más de 20000 biopsias (6).

El cribado se ha establecido como beneficioso en hombres entre 55 años y 69. Se ha visto beneficio en adelantar a 45 años la edad en aquellos con historia familiar de CP. En general se acepta el cribado con PSA en cualquier hombre con una esperanza de vida superior a 10 o 15 años (7). Se ha visto que una única determinación de PSA no mejora la supervivencia (6).

3. Diagnóstico

El diagnóstico en Medicina es el procedimiento que consiste en la identificación de una enfermedad. En el caso del CP, la sospecha de la enfermedad está basada habitualmente en la elevación del PSA y en el tacto rectal. El diagnóstico se realiza de forma definitiva con el análisis del tejido de una biopsia o tras una resección transuretral o adenomectomía (7).

3.1 PSA

El PSA es una proteína órgano-específica que se puede elevar por condiciones que no son malignas. No hay un valor estándar por el cual debemos sospechar CP, se trata de una variable continua que a medida que aumenta el valor, aumenta la probabilidad de CP. Se establece que a partir de un valor de 10 ng/ml la sospecha de cáncer es alta si no existe una patología benigna que lo justifique (8).

En hombres que presentan un valor de PSA entre 3 y 10 ng/ml con un tacto rectal que no es sospechoso de malignidad se deben utilizar otro tipo de pruebas para tomar la decisión de realizar una biopsia. Estas pruebas se describen a continuación (7):

- Cociente entre el PSA libre y el total: se detectó un 56% de CP en las biopsias de los hombres con un cociente por debajo de 0.1, y sólo un 8% de cáncer en aquellos con un cociente por encima de 0.25 (9).
- Test séricos adicionales: se han comercializado en Estados Unidos. Uno de ellos es el test Prostate Health Index (PHI) que basa la decisión de la toma de biopsia en función de: cociente de PSA libre y total; y la isoforma 2-pro-PSA. Otro test de este tipo sería el test de las 4 Kalicreínas que tiene en cuenta el PSA libre, intacto, total; la peptidasa similar a Kalicreína 2 y además la edad, el tacto rectal y la realización de biopsias previas. Ambos test demostraron un área bajo la curva de 0.69 para detectar cualquier grado de cáncer, y un 0.71 para la puntuación 2 o por encima en la escala histológica *International Society of Urological Pathology* (ISUP) (10).
- Test en orina adicionales: el test del PCA3 se mide en orina tras 3 pasadas de masaje prostático, se trata de un biomarcador basado en RNA no codificante. Ha demostrado mejores valores debajo de la curva que el cociente de PSA libre/total.

Se utiliza sobre todo en pacientes con una biopsia que no ha mostrado malignidad pero que presenta sospecha (7,11).

- Otro test ha sido el Select MDX que también se ha basado en la determinación de RNA en la orina de *HOXC6* y *DLX*. En este caso se evalúa tanto la probabilidad de cáncer como de cáncer de alto riesgo (ISUP por encima de 2) teniendo en cuenta si se han realizado biopsias previas negativas, la densidad de PSA, edad e historia familiar, alcanzando un área bajo la curva de 0.9 (12).
- Se están investigando otros marcadores como el *TMPRSS2-ERG* fusión con el gen ERG. Su detección unida al valor de PCA3 y al valor sérico de PSA aumentó el diagnóstico de CP, este test se conoce como la Michigan Prostate Score (MiPS). (13) Otro test es el Exo Dx Prostate IntelliScore basado en que las células tumorales pueden secretar exosomas que contengan mRNA para el diagnóstico de tumores de alto riesgo. En este caso se demostró un ahorro del 27% de biopsias innecesarias. (14) Estos 2 test son aún considerados experimentales (7).

3.2. Biopsia prostática

Se trata del medio diagnóstico más indicado, se trata de la extracción de tejido próstatico mediante una punción con aguja gruesa, ya sea transrectal o transperineal. Se debe evitar el uso de la resección transuretral (RTU) prostática para el diagnóstico (7). Una única elevación de PSA no debe utilizarse para realizar una biopsia, sino que deberá repetirse la toma de PSA en unas semanas en el mismo laboratorio y sin manipulaciones de la vía urinaria, infección del tracto urinario (ITU) o eyaculación (13).

3.3. Resonancia Magnética multiparamétrica

La resonancia magnética nuclear (RMN) es aquella prueba diagnóstica que se basa en el efecto de resonancia magnética nuclear para adquirir información sobre composición y forma de los tejidos y que un ordenador transforma en imágenes.

En un metaanálisis de 2019 se comparó la RMN multiparamétrica con la biopsia de saturación (aquella que obtiene 20 o más cilindros prostáticos). La resonancia alcanzó una sensibilidad para ISUP igual o mayor a 2 de 0.91 con una especificidad de 0.37. En caso de ISUP mayor o igual a 3 la sensibilidad fue de 0.95 y la especificidad de 0.35 (14).

Además, la imagen por RMN permite realizar una biopsia que une la imagen de exploración en directo ecográfica con las imágenes obtenidas de las RMN, también

conocía como biopsia fusión. Se comparó la biopsia sistemática (8 a 15 cilindros) con la biopsia fusión. Se vio que la mejora de la ratio de detección en favor de la RMN en pacientes con primera biopsia fue de 1.05 en ISUP mayor o igual a 2. En pacientes con alguna biopsia negativa previa la mejora de la ratio fue de 1.44. Utilizada en combinación con la biopsia sistemática supone una mejora del 20% de cáncer ISUP mayor o igual a 2 en pacientes de primera biopsia. En caso de pacientes con una biopsia negativa previa aumenta el diagnóstico entre un 40 y un 50% (15).

La biopsia fusión ha demostrado también reducir la ratio de detección de CP ISUP 1, en pacientes con biopsia negativa previa fue de 0.62 y en pacientes de primera biopsia 0.63. Además, se reduce el número de diagnóstico de cáncer que no es significativo clínicamente (ISUP 1 con una extensión máxima en el cilindro de 6 mm). Por lo tanto, la biopsia fusión reduce el riesgo de sobrediagnóstico de enfermedad de bajo riesgo en comparación con la biopsia sistemática (16).

Otro valor que ha sumado la RMN ha sido evitar las biopsias innecesarias. Estableciendo un PIRADS igual o mayor de 3 para indicar primera biopsia a pacientes se ahorró un 30% de las mismas con un 11% de pérdida de diagnóstico de cáncer ISUP mayor o igual a 2 (14).

3.4 Tomografía Computarizada

La Tomografía Computarizada (TC) es una técnica diagnóstica basada en la emisión de rayos X sobre el cuerpo humano o alguna parte concreta del mismo de forma que se producen múltiples imágenes, que permiten visualizar la anatomía humana y sus posibles alteraciones patológicas. Actualmente la reconstrucción por ordenador permite visualizar imágenes en diferentes ejes más allá del axial.

En el CP se utiliza para localizar la enfermedad ganglionar a través del tamaño. Se consideran adenopatías malignas aquellas con un eje corto mayor de 8 mm en pelvis y de 10 mm en el resto de localizaciones. La sensibilidad es menor al 40% (17). Es recomendable solicitar TC en pacientes de nuevo diagnóstico en riesgo intermedio con ISUP igual o mayor a 3 junto con gammagrafía ósea o en pacientes de alto riesgo D'Amico (7).

3.5. Gammagrafía ósea

Una gammagrafía es una prueba diagnóstica a través de imágenes que se obtienen al detectar un marcador radioactivo previamente inyectado que se adhiere a tejidos concretos.

La gammagrafía con Tecnecio 99m es el método más extendido de diagnóstico de metástasis en el hueso en CP. Presenta una sensibilidad y especificidad de 79 y 82%, relativamente (18). No obstante, esta detección está muy influenciada por 3 factores: grado tumoral ISUP, estadio clínico y el nivel de PSA. Se debe realizar en cualquier paciente que presente dolor óseo sospechoso (19).

3.6. PET/TC Colina

La tomografía por emisión de positrones (PET) consiste en un examen diagnóstico a través de imágenes que se obtienen al detectar un trazador previamente inyectado. Estas imágenes se suman a las obtenidas por TC para conocer la funcionalidad del trazador en los órganos. Dicho trazador está formado por una molécula con funcionalidad en el organismo unido a un marcador radioactivo.

En el caso de PET/TC Colina presenta una sensibilidad parecida para detectar metástasis a la gammagrafía ósea, con una especificidad superior con menor diagnóstico de lesiones inespecíficas. Además, presenta una sensibilidad y especificidad de 62 y 92% respectivamente para detección de metástasis ganglionares (20).

3.7. PET/TC marcado con antígeno prostático específico

En un metaanálisis se ha demostrado una sensibilidad y especificidad de 86 y 86% respectivamente con respecto a los resultados de linfadenectomías para detección de metástasis ganglionares. La media de tamaño diagnóstico fue de 13.1 ± 7.7 mm; y los no detectados fueron de 3.9 ± 2.2 mm. En este caso también se ve modificado por el nivel de PSA y el grado tumoral ISUP. En el diagnóstico inicial se está utilizando para localización de metástasis con sensibilidad muy variable entre 33-99% y especificidad 82-100% (21). Ver resumen de pruebas diagnósticas en Tabla 1.

Tabla 1: Tabla resumen de pruebas diagnósticas

<u>Estudio diagnóstico</u>	<u>Utilidad</u>
PSA	Screening, estadificación y seguimiento
Biopsia prostática guiada por ecografía	Diagnóstico anatomopatológico y estadificación
RMN	Screening, mejora precisión diagnóstico anatomopatológico y extensión
TC	Extensión
Gammagrafía ósea	Extensión
PET/TC Colina	Extensión con aumento de especificidad con respecto a gammagrafía
PET/TC marcado con PSA	Extensión con aumento de sensibilidad y especificidad en diagnóstico de metástasis ganglionares.

4. Estadificación

Estadificación consiste en evaluar la extensión o gravedad de una enfermedad secundaria a una neoplasia maligna. Esta depende de la neoplasia en cuestión o incluso en qué fase de la enfermedad nos encontremos. En CP existen varias formas de estadificar que condicionaran el pronóstico y el tratamiento.

4.1. Escala de Gleason

La escala de Gleason está basada únicamente en la estructura de las células tumorales y se relaciona directamente con el comportamiento clínico. Está basada en la escala de desarrollo y el grado de diferenciación, de esta forma se estadifica del 1 al 5 siendo el más diferenciado el 1 y 5 el menos diferenciado. Se elige primero el más predominante y segundo el más agresivo (22).

Una puntuación Gleason que sume 5 o menos no debe ser reportada como maligna. En 2014 ISUP creó una escala modificada de Gleason clasificando del 1 al 5 con el objetivo de igualar la escala con otras neoplasias, eliminar el hecho de que los adenocarcinomas más diferenciados estaban graduados con escala 6; y diferenciar los patrones “3+4” y “4+3” que presentan diferencias clínicas significativas. Está representada en la Tabla 2 (23).

Tabla 2: Estadificación histológica de International Society of Urological Pathology (Epstein JJ et al. American Journal of Surgical Pathology. 2016).

<u>Puntuación Gleason</u>	<u>Grado ISUP</u>
3+3	1
3+4	2
4+3	3
8 (4+4 o 3+5 o 5+3)	4
9- 10	5

4.2. Estadificación TNM

Cualquier escala de estadificación pretende agrupar pacientes con pronóstico clínico similar. La tabla 3 recoge la clasificación de 2017 basada en tumor (T) ganglios (N de “node”) y metástasis (M) (24)

Tabla 3: Clasificación TNM. (Brierley J, *Classification of Malignant Tumors International Union Against Cancer 2017*).

T: tumor primario. Debe estar basado únicamente en el tacto rectal	
Tx	No puede ser realizado
T0	Ausencia de tumor primario
T1	El tumor no es palpable
	T1a: Tumor incidental en menos de 5% del material resecado T1b: Tumor incidental en más del 5% del material resecado T1c: tumor hallado en biopsia prostática
T2	Tumor palpable y confinado a la próstata
	T2a: Tumor circunscrito a un lóbulo en menos de la mitad del mismo T2b: Tumor circunscrito a un lóbulo en más de la mitad del mismo T2c: tumor circunscrito a ambos lóbulos
T3	El tumor que atraviesa la cápsula prostática
	T3a: invasión extracapsular T3b: invasión de las vesículas seminales
T4	El tumor está fijo o infiltra órganos colindantes distintas a las vesículas seminales: como el esfínter externo, recto, músculos elevadores y/o la pared pélvica.
N: ganglios linfáticos pélvicos regionales	
Nx	No se conoce la extensión ganglionar regional
N0	No existe metástasis regional pélvica
N1	Afectación ganglionar metastásica regional
M: Metástasis a distancia	
M0	No existe afectación metastásica
M1	Metástasis a distancia
	M1a: afectación ganglionar que no es regional M1b: metástasis ósea M1c: cualquier otra localización

4.3. Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología

Se trata de grupos de riesgo de recurrencia bioquímica para tumores localizados o localmente avanzados basada en la escala de D'Amico, se muestra en la tabla 4. (7)

Tabla 4: Grupos de riesgo de European Association of Urology (Arakelyan GA. Onkourologiya. 2019).

<u>Bajo riesgo</u>	<u>Riesgo intermedio</u>	<u>Alto riesgo</u>	
PSA menor a 10ng/ml	PSA entre 10 y 20 ng/ml	PSA superior a 20ng/ml	Cualquier PSA
ISUP 1	ISUP 2 o 3	ISUP 4 o 5	Cualquier ISUP
cT1 a cT2a	cT2b	cT2c	cT3- 4 y/o cN1
Localizado			Localmente avanzado

4.4. Evaluación de esperanza de vida y estado de salud

Conocer el estado de salud y la esperanza de vida es importante a la hora de elegir un tratamiento adecuado cuando enfrentamos un diagnóstico de CP que, como se ha mencionado, la edad media de diagnóstico son 69 años en España (4).

Los tratamientos activos benefician sobre todo a pacientes que presentan CP localizado de riesgo intermedio y alto; con expectativa de vida superior a 10 años. Los pacientes añosos y aquellos con peor estado de salud basal presentan un menor beneficio en supervivencia cáncer específica y calidad de vida cuando se tratan de forma activa, en comparación con aquellos que se realiza vigilancia activa (25).

Por otro lado, se ha demostrado en un ensayo clínico aleatorizado, que la realización de tratamiento con prostatectomía radical en pacientes mayores de 65 años se ha asociado a un menor riesgo de metástasis y uso de bloqueo hormonal. De la misma forma se ha demostrado un control oncológico similar con radioterapia con intensidad modulada o guiada por imagen (25).

Por ello se debe establecer una correcta evaluación de la esperanza de vida y estado de salud con objetivo de evitar sobretratar a pacientes frágiles o infratratarse a enfermos con buena expectativa de vida. Para ello se deben evaluar los siguientes aspectos:

- Esperanza de vida: su valoración debe ser individualizada, sin embargo, destaca la velocidad de la marcha como una buena variable predictiva que debe ser evaluada en 6 metros, imagen que viene representada en la figura 2 (21).

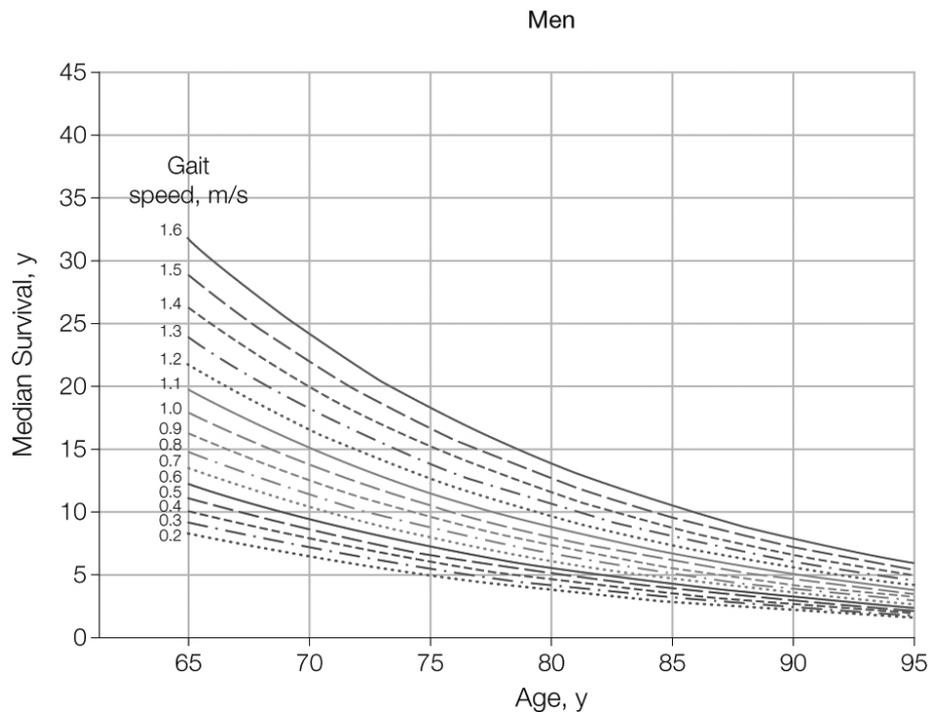


Figura 2: Test de la marcha. (Studenski S, et al. JAMA 2011).

- Cribado del estado de salud: el tratamiento de pacientes de mayor edad debe basarse en la herramienta de cribado *Geriatric 8*. Aquellos pacientes con una puntuación de más de 14 en dicho test o aquellos vulnerables, con problemas reversibles, deberían recibir tratamientos similares a pacientes jóvenes. Por otro lado, pacientes con criterios de fragilidad deben recibir tratamiento adaptado a sus circunstancias. En aquellos con una puntuación menor de 14 debe evaluarse las comorbilidades, estado nutricional, condiciones físicas y cognitivas con objetivo de comprobar si las alteraciones detectadas son reversibles (26). Ver detalles en la Tabla 5.

Tabla 5: Test Geriatric 8. (Boyle HJ, European Journal of Cancer 2019)

<i>Elementos</i>	<i>Respuestas</i>
¿Ha disminuido la ingesta en los últimos 3 meses por pérdida de apetito, problemas digestivos de masticado o al tragar?	0 = disminución grave de la ingesta
	1 = disminución moderada de la ingesta
	2 = ausencia de disminución
¿Ha perdido peso en los últimos 3 meses	0 = mayor de 3 kg
	1 = no es consciente
	2 = pérdida de peso entre 1 y 3 kilos
	3 = no ha perdido peso
Morbilidad	0 = vida en silla o cama
	1 = vida cama sillón en su domicilio
	2 = es capaz de salir de su domicilio
Problemas neuropsicológicos	0 = demencia o depresión grave
	1 = demencia moderada
	2 = no presenta problemas
Índice de masa corporal (IMC)	0 = IMC < 19
	1 = IMC 19 to < 21
	2 = IMC 21 to < 23
	3 = IMC \geq 23
¿Tiene más de 3 medicamentos prescritos de forma habitual?	0 = si
	1 = no
¿Cómo considera su nivel de salud en comparación con otras personas de su edad?	0.0 = no tan bueno
	0.5 = no lo sabe
	1.0 = similar
	2.0 = mejor
Edad	0: \geq 85
	1: 80-85
	2: < 80
<i>Puntuación total</i>	<i>0-17</i>

- La comorbilidad: es un predictor de muerte no relacionada con el cáncer en su fase localizada siendo más importante que la edad. La mayoría de los pacientes con comorbilidad alta mueren de otras patologías, independientemente de la edad o de la agresividad del tumor (27).

- Estado nutricional: puede ser evaluada por la pérdida de peso en los últimos 3 meses. Si el paciente no ha perdido peso o menos de un 5%, presenta un buen estado nutricional. Si ha presentado una pérdida de entre 5 y 10 % se encuentra en riesgo de malnutrición. Una pérdida por encima del 10 % se considera desnutrición severa (28).
- Condición cognitiva: puede ser cribada a través de la escala llamada mini-Cog, que establece la capacidad del paciente para tomar una decisión informada (29).
- Función física: el diagnóstico se puede basar en la puntuación de Karnofsky o en ECOG. También se debe evaluar la dependencia para el desarrollo de las actividades de la vida diaria (30).

5. Tratamiento del cáncer de próstata

El tratamiento de una enfermedad se define como el conjunto de medios para curar o aliviar una enfermedad. Existen multitud de tratamientos para el CP dependiendo de su estadio y condiciones del paciente que se van a desarrollar a continuación.

5.1 Tratamiento diferido

El tratamiento diferido consiste en evitar actitud terapéutica activa inmediata tras el diagnóstico, para optar por vigilar la agresividad y extensión del tumor. Dependiendo de las circunstancias del paciente y su evolución puede plantearse el tratamiento activo más tardío si es necesario. Responde a la necesidad de evitar los daños que pueda generar el tratamiento al paciente (27).

Se ha demostrado que en la enfermedad localizada es prioritario que la esperanza de vida del paciente sea superior a 10 años para plantear tratamiento local y obtener beneficios clínicos. La observación ha demostrado una supervivencia cáncer específica a los 10 años de entre 82 y 87 %, llegando al 80-95% en aquellos adenocarcinomas en estadio T1 o T2 y con una clasificación ISUP de 2 o menor. La observación fue más efectiva en hombres entre 65 y 75 años con CP de bajo riesgo (31–33).

Es importante tener en cuenta que la comorbilidad del paciente es más importante que la edad para pronosticar la esperanza de vida. La comorbilidad aumenta las posibilidades de morir por un evento ajeno al CP en paciente con una corta esperanza de vida. Este hecho fue demostrado en un análisis a 10 años de seguimiento de pacientes pluripatológicos de más de 65 años que no recibieron tratamiento curativo y se descubrió que la mayoría

murieron por causas concurrentes; independientemente de su edad inicial. Se vio que en estos pacientes la agresividad del tumor tenía poca repercusión sobre la supervivencia global (27).

Existen 2 modalidades de tratamiento diferido, vigilancia activa y espera vigilante:

5.1.1. Vigilancia activa

La vigilancia activa es el manejo del paciente con CP que tiene como fundamento impedir el tratamiento innecesario del CP, pero a su vez establecer la situación adecuada para indicar el tratamiento curativo en aquellos pacientes que lo necesiten. Se trata, por tanto, de un programa con seguimiento regular y protocolario con reglas prefijadas para indicar tratamiento curativo cuando la enfermedad amenace la vida del paciente. El seguimiento se realiza a través del tacto rectal, PSA, rebiopsia y RMN (34).

Se ha visto que la supervivencia global y cáncer específica son óptimas, aunque al menos un tercio fueron reclasificados durante el seguimiento y recibieron tratamiento curativo ya sea por aumento de la extensión, estadio, progresión o por preferencia del paciente. Los estudios son heterogéneos en cuanto a la inclusión de los pacientes, los protocolos de seguimiento y en cuándo debe iniciarse el tratamiento curativo (35).

Los criterios de inclusión llevaron a realizar un consenso internacional (DETECTIVE) de todos los aspectos que conlleva la vigilancia activa. Los criterios más utilizados incluían (36):

- Grado ISUP 1,
- Estadio clínico T2a o inferior
- PSA por debajo de 10 ng/ml.
- Densidad de PSA por debajo de 0.15 ng/ml/cc.

No hubo consenso en la cantidad máxima de cilindros de la biopsia prostática que deben presentar enfermedad, aunque se reconoció que el estadio t2c o amplia extensión prostática de la enfermedad en la RMN debería ser criterios de exclusión para esta modalidad. También se acordó que pacientes con CP ISUP 2 favorables podrían ser candidatos a esta modalidad.

Se consensuó realizar biopsia de confirmación en los primeros 6 o 12 meses es fundamental para evitar el riesgo de infraestadaje. (36)

Por último, se establecieron como criterios de exclusión claros:

- ISUP 3 o superior.
- Presencia de otras variantes histológicas
- Presencia de invasión extraprostática o linfovascular en la biopsia.

La RMN juega un papel fundamental ya que puede reclasificar en el momento de la biopsia de confirmación. Se ha visto que la biopsia dirigida por RMN sumada con la biopsia sistemática aumenta la detección de tumor de mayor grado. Se ha decidido en el consenso internacional DETECTIVE que aquellos pacientes candidatos a vigilancia activa que hayan sido diagnosticados con biopsia dirigida por RMN sumada a biopsia sistemática no necesitan una biopsia de confirmación (36).

Se ha establecido que el seguimiento se realice con (36):

- Tacto rectal al menos 1 vez al año
- Determinación de PSA al menos 1 vez cada 6 meses
- Repetición de la biopsia
- RMN.

5.1.2. Espera vigilante

Consiste en el manejo conservador de pacientes que no son candidatos a tratamiento curativo en el momento de ser diagnosticados. Los pacientes son vigilados para evaluar posibles síntomas de la enfermedad para establecer tratamiento paliativo con el objetivo de mantener la calidad de vida.

Se comparó el tratamiento activo con prostatectomía radical frente a la espera vigilante y sólo se halló mejora de la supervivencia cáncer específica y global en pacientes de alto riesgo o con PSA por encima de 10. No se observó efectos sobre la calidad de vida ni psicológicos en los pacientes en espera vigilante (37).

5.2. Prostatectomía Radical

El objetivo de la técnica es la eliminación del cáncer manteniendo la utilidad de los órganos de la pelvis. La intervención consiste en la escisión de la próstata y vesículas seminales en su totalidad, seguida de la realización de la anastomosis vesico-uretral. La técnica ha evolucionado desde las primeras descripciones de la cirugía abierta retropúbica hasta la realización de la técnica laparoscópica o robot-asistida. Las complicaciones más habituales de la cirugía son la incontinencia urinaria y la disfunción eréctil (38).

Se han analizado los resultados a largo plazo en supervivencia de la prostatectomía radical en ensayos clínicos aleatorizados, en su mayoría pacientes de intermedio y bajo riesgo. El primer estudio SPCG-4 se desarrolló entre 1989 y 1999 con una supervivencia cáncer específica que llegó al 80.4 %. Estudios más modernos como PIVOT y ProtecT llegaron al 91.5% y 99 % respectivamente. Este último comparó la prostatectomía radical con la radioterapia externa sin llegar a diferencias significativas pronósticas (39).

En el caso de tumores de alto riesgo se debe seleccionar a aquellos pacientes que no presenten afectación de la pared pélvica ni del esfínter urinario. El paciente debe ser advertido de que la cirugía forma parte de un tratamiento multimodal (40).

5.2.1. Linfadenectomía pélvica

La linfadenectomía consiste en la eliminación de los ganglios linfáticos pélvicos durante la realización de la prostatectomía radical. El beneficio de la linfadenectomía en términos de supervivencia es controvertido. Sin embargo, se considera muy importante su valor en el pronóstico tras la cirugía; por lo que se han establecido nomogramas que establecen el riesgo de afectación ganglionar pélvica e indican la realización de la linfadenectomía (41).

5.3. Radioterapia de haz externo

Existen técnicas que han mejorado en los últimos años como son la radioterapia de intensidad modulada o la radioterapia de arco volumétrico. Tiene la particularidad de adaptarse a los contornos de la próstata, disminuyendo el daño a los órganos colindantes como el recto. El plan de tratamiento debe contener dosis límite prefijadas a órganos colindantes con tejido normal.

Según lo visto en varios ensayos clínicos la dosis mínima recomendada es de 74 Grays. En pacientes de riesgo intermedio y alto se debe incluir neoadyuvancia o adyuvancia con

terapia de deprivación hormonal (42). Se entiende que en riesgo intermedio debe durar 6 meses y en alto riesgo 2 o 3 años (43).

Los efectos secundarios a radioterapia más comunes son los gastrointestinales y urinarios. Hasta un 72% de los pacientes experimentan efectos adversos genitourinarios y un 41% gastrointestinales. (44).

No se han encontrado diferencias significativas entre resultados de supervivencia global ni cáncer específico entre prostatectomía radical y radioterapia externa (39).

5.4. Braquiterapia

La braquiterapia de baja tasa utiliza semillas radiactivas implantadas de forma permanente en la próstata. Existen unos criterios en cuanto a la elección de la braquiterapia: adenocarcinomas prostáticos en estadio cT1b a T2a sin afectación ganglionar o metastásica; debe incluir menos del 50% del total de cilindros afectados de tumor en grado ISUP 1 y menos del 33% de los cilindros afectados en grado ISUP 2; un PSA inicial por debajo de 10ng/ml y un volumen prostático por debajo de 50cc, un índice internacional de síntomas prostáticos por debajo de 12 y un flujo máximo urinario por encima de 15ml/s en flujometría (45).

Se ha visto una supervivencia libre de recurrencia bioquímica después de 10 años de entre 65 y 85%. Se ha asociado una dosis superior a 140 Grays con un mayor control de la recurrencia (46).

La braquiterapia de alta tasa utiliza semillas radiactivas que se dejan de forma temporal. Se puede aplicar en una única o en varias fracciones y siempre va acompañada al menos de 45 Grays de radioterapia externa. Presenta efectos adversos superiores a la de baja tasa pero que resuelven en semanas (47).

5.5. Terapia hormonal

La terapia hormonal consiste en reducir los niveles de testosterona sérica por debajo de 50 ng/dL aunque actualmente, con la mejora de los métodos de detección, se ha visto que los niveles bajan por debajo de 15 ng/dL tras la castración quirúrgica. Aunque hay autores que consideran que el nivel más adecuado de castración es aquel por debajo de 20 ng/dl, en la actualidad todavía se considera como criterio una testosterona por debajo de 50 ng/dl. (48).

La deprivación androgénica es plausible eliminando la secreción testicular de andrógenos o bien, inhibiendo la función de los andrógenos sobre los receptores. Los métodos conocidos son: orquiectomía bilateral, estrógenos, análogos de la hormona liberadora de la gonadotropina (Análogos de la LHRH), antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, antiandrógenos y los nuevos compuestos.

5.5.1. Análogos LHRH

Se trata de la forma más habitual de bloqueo hormonal en la práctica clínica. Se administran en inyecciones Depot en tratamiento mensuales, trimestrales, semestrales o incluso anuales. La primera inyección supone un incremento de la liberación de hormona luteinizante y foliculoestimulante, lo que supone un aumento de la testosterona sérica entre el tercer y séptimo día de la inyección. Esto puede tener efectos clínicos deletéreos como aumento del dolor óseo, retención urinaria agua, compresión espinal aguda y estatus hipercoagulativo con trombosis asociada. Los pacientes que presentan riesgo son aquellos con enfermedad de alto volumen, sintomáticos o con metástasis óseas. El uso de antiandrógenos concomitantes disminuye la incidencia de este aumento momentáneo de testosterona (49).

El tratamiento crónico con análogos LHRH supone la supresión de los receptores de LHRH y por tanto una supresión en la secreción de hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH) y testosterona. El nivel de castración se consigue habitualmente entre las 2 y las 4 semanas del inicio del tratamiento. No se han observado diferencias significativas en la supervivencia con respecto a la orquiectomía bilateral (50). Algunos ejemplos de fármacos son: leuprorelina, triptorelina, goserelina e histrelina

5.5.2. Antagonistas LHRH

En este caso se unen de forma inmediata a los receptores LHRH provocando un descenso de los niveles de LH, FSH y testosterona sin aumento previo. En este caso no existe fórmula de larga duración y sólo existe el tratamiento mensual. Degarelix es el fármaco representativo de este grupo y consigue los niveles de castración a los 3 días de su inyección (51).

5.5.3. Antiandrógenos

Son fármacos de toma oral y se dividen en 2 grupos:

- Antiandrógenos esteroideos: presentan como efectos adversos ginecomastia, toxicidad cardiovascular y hepatotoxicidad. Un ejemplo es el acetato de ciproterona.
- Antiandrógenos no esteroideos: presentan como efectos adversos hepatotoxicidad y ginecomastia. Como ventaja presentan protección de la densidad mineral ósea y menor pérdida de libido. El más utilizado es Bicalutamida por su mejor tolerabilidad y por haber sido estudiado en monoterapia (52).

5.5.4. Indicaciones del tratamiento hormonal

- Como tratamiento neoadyuvante en la radioterapia (42).
- En el tratamiento de la recurrencia tras intento curativo se han realizado numerosos estudios obteniendo como conclusión que debe aplicarse en aquellos con alto riesgo y con expectativa de vida larga (53).
- En el tratamiento del adenocarcinoma de próstata metastásico que puede llevar asociado otros tratamientos: Docetaxel (54), Abiraterona (53), Enzalutamida (55), Apalutamida (56) radioterapia o cirugía sobre metástasis.
- En el tratamiento del CP resistente a castración (CPRC) en el que el tratamiento hormonal debe mantenerse y añadirse otros tratamientos.

5.5.5 Tratamientos hormonales de reciente aparición

Han sido desarrollados en su comienzo como fármacos para la fase de resistencia a castración, aunque poco a poco están ganando indicaciones en otros estadios de la enfermedad.

- Acetato de Abiraterona: se trata de un inhibidor del citocromo CYP17 que disminuye el nivel de testosterona intracelular al suprimir su formación en la glándula suprarrenal. Debe ser utilizado con prednisona o prednisolona para prevenir el hiperaldosteronismo. (7)
- Enzalutamida, Apalutamida o Darolutamida: son anti andrógenos no esteroideos de nueva generación con mayor afinidad por el receptor androgénico (RA) que

Bicalutamida. Evitan que RA se trasfiera al núcleo y por tanto suprimen cualquier actividad agonista. (7)

5.6. Tratamiento del cáncer de próstata metastásico

La media de supervivencia de un paciente diagnosticado de metástasis de adenocarcinoma de próstata se encuentra en torno a los 42 meses, aunque la población es heterogénea. Se han sugerido diversos factores que pueden tener que ver con la supervivencia como la localización visceral de las metástasis, el número y localización de las metástasis óseas, el grado ISUP, el estado general del paciente y el PSA inicial o la fosfatasa alcalina (57).

El volumen de la enfermedad ha sido el predictor utilizado en el estudio CHAARTED (*Chemo-Hormonal Therapy versus Androgen Ablation Randomized Trial for Extensive Disease in Prostate Cancer*). De la misma forma el estudio LATITUDE estableció pacientes de alto riesgo. Esta clasificación condiciona en la actualidad el tratamiento que reciben los pacientes metastásicos (53,54). Ver detalles en la tabla 6.

Tabla 6: Definición de alto volumen y riesgo (Fizazi K, et al. *New England Journal of Medicine*. 2015; Sweeney CJ et al. *New England Journal of Medicine*. 2015).

	<u>Alto</u>	<u>Bajo</u>
CHAARTED (Volumen)	<ul style="list-style-type: none"> • 4 o más metástasis óseas con al menos 1 fuera del eje de la columna vertebral <li style="text-align: center;">o • Metástasis visceral 	No cumple criterios de alto volumen
LATITUDE (Riesgo)	Al menos 2 condiciones: <ul style="list-style-type: none"> • 3 o más metástasis óseas • Metástasis visceral • Grado ISUP 4 o superior 	No cumple criterios de alto riesgo

La terapia de deprivación androgénica (TDA) ha sido la referencia en los últimos 50 años en el tratamiento de la enfermedad metastásica, ya sea con orquiectomía o con análogos o antagonistas de la LHRH. (58)

En la actualidad existen numerosos estudios en combinación con la terapia de deprivación hormonal, que sigue siendo parte troncal del tratamiento en esta fase de la enfermedad. En todos los casos se aplica dicha terapia de forma continua, excluyendo el tratamiento intermitente.

5.6.1. Deprivación androgénica en combinación con quimioterapia

Existen 3 ensayos que compararon la TDA sola con la TDA y Docetaxel. En todos los estudios los pacientes debían tener un estado general que permitiese el tratamiento, medido por escalas funcionales que predicen la evolución con quimioterapia u otros fármacos oncológicos en el paciente como son el índice de Karnofsky o la escala ECOG. El objetivo principal fue la supervivencia global. En todos se observó una Hazard Ratio favorable al grupo de los tratados con Docetaxel, especialmente en aquellos pacientes con debut metastásico y sin tratamiento local previo con enfermedad de alto volumen (54,59,60).

En un meta-análisis de los 3 ensayos se ha visto un Hazard Ratio de 0.77 con un aumento de la supervivencia en 4 años de 9% (61).

5.6.2. Deprivación androgénica en combinación con otros tratamientos hormonales

- Acetato de Abiraterona: se ha estudiado la terapia combinada de TDA con Abiraterona y prednisona frente a la TDA con prednisona en 2 ensayos clínicos; en paciente con CP metastásico sensible a tratamiento hormonal. El objetivo de los estudios fue la supervivencia global que alcanzó una Hazard Ratio de 0.62 y 0.63, en los grupos de alto riesgo. También se alcanzaron objetivos secundarios como el aumento de la supervivencia libre de progresión, aumento del tiempo hasta progresión radiológica y al dolor. No se reportó ninguna muerte secundaria al tratamiento (53,62).
- Enzalutamida: en hombres que padecen CP metastásico sensible a tratamiento hormonal ha demostrado aumentar la supervivencia libre de progresión radiológica. En otro estudio demostró aumentar la supervivencia global en dicha fase de la enfermedad en pacientes de bajo y alto volumen, con terapia previa o con tratamiento concomitante con Docetaxel (55,63).
- Apalutamida: en este caso se realizó un ensayo que tomó como objetivo la supervivencia libre de progresión radiológica y la supervivencia global. La

Hazard Ratio fue 0.48 y 0.67 respectivamente en un periodo de seguimiento de 24 meses. En este caso los pacientes presentaban enfermedad metastásica sensible a tratamiento hormonal, en algunos casos con tratamiento local previo, con enfermedad de bajo y alto volumen y otros que habían sido tratados con Docetaxel previo (56).

5.6.3. Deprivación androgénica en combinación con radioterapia

Se han realizado varios ensayos clínicos comparando la TDA en monoterapia frente a la combinación con radioterapia sobre el lecho prostático. En el primero de ellos se demostró aumento de la media de la progresión de PSA a favor de la radioterapia. En el estudio STAMPEDE se obtuvo que en los pacientes con CP metastásico sensible a tratamiento hormonal de bajo volumen presentaron una mejora de la supervivencia global (64).

En dicho estudio y en metaanálisis posteriores se ha visto que no existe aumento de supervivencia en pacientes no seleccionados. Sin embargo, existe una clara mejora de la supervivencia global, de un 7% en 3 años, en aquellos con 3 o menos metástasis óseas. (65).

5.7. Tratamiento del Cáncer de Próstata Resistente a Castración

CPRC es aquel que encontrándose en TDA y con testosterona sérica en niveles inferiores a 50ng/dl presenta uno de estos 2 criterios de progresión (7):

- Progresión bioquímica: 3 ascensos de PSA consecutivos con al menos 1 semana de separación de al menos un 50% del valor nadir y con un PSA superior a 2ng/ml.

Progresión radiológica: 2 o más nuevas lesiones óseas en gammagrafía o progresión de tejido blando según los criterios RECIST 1.1 (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*).

5.7.1. Tratamiento de CPRC no metastásico

Los pacientes en seguimiento con TDA suelen presentar análisis con PSA frecuentes; lo que resulta en una detección precoz de la progresión bioquímica, que en un tercio de los casos supondrá el desarrollo de metástasis óseas en 2 años. En estos casos se ha determinado que el nivel de PSA basal y el tiempo de doblaje de PSA se ha asociado con el tiempo a la aparición de la primera metástasis ósea y la supervivencia global (66).

Se han realizado ensayos clínicos con Enzalutamida, Apalutamida y Darolutamida cada uno frente a placebo, en pacientes con CPRC sin metástasis con un tiempo de doblaje de PSA por debajo de 10 meses, manteniendo siempre la TDA. En todos los ensayos se ha visto un aumento de la supervivencia libre de metástasis; y aumento de la supervivencia global (67–69).

5.7.2. Tratamiento de CPRC metastásico

Los hombres en tratamiento con TDA presentarán evidencia de progresión de la enfermedad en algún momento durante su evolución, no obstante, debe mantenerse dicha terapia (7).

Se han estudiado tratamientos que se añaden a la TDA en estos pacientes y pueden secuenciarse en función de las características de los fármacos en relación a las comorbilidades y el estado general del paciente:

- Abiraterona: se evaluó en pacientes sin tratamiento con quimioterapia previa y asintomáticos u oligosintomáticos en comparación con placebo, ambos combinados con Prednisona. En este caso se excluyeron aquellos con metástasis viscerales. Se cumplieron los objetivos de supervivencia global y de supervivencia libre de progresión. Los efectos adversos relacionados con la función hepática y el exceso de mineralocorticoides fueron más frecuentes con Abiraterona, aunque fueron leves (70).
- Enzalutamida: se comparó con placebo y se incluyó un pequeño grupo de pacientes con metástasis viscerales. Ninguno había recibido quimioterapia previa. Se alcanzaron los objetivos primarios de supervivencia libre de progresión radiológica y global. Los efectos adversos más habituales fueron hipertensión arterial y fatiga que fueron bien tolerados (71).
- Docetaxel: se demostró un aumento de supervivencia de 2 a 2.9 meses comparado con Mitoxantrona con Prednisona. Se ha establecido según grupos pronósticos que la supervivencia global varía entre 25.7 meses, 18.7 hasta 12.8 meses. La edad no excluye el tratamiento con Docetaxel, pero deben evaluarse las comorbilidades con detenimiento (72).
- Sipuleucel – T: presenta aumento de supervivencia en pacientes asintomáticos o mínimamente sintomáticos. Demostró supervivencia global de 25.8 meses frente

a 21.7 meses en el grupo de placebo. Llamó la atención en el estudio que no se redujo el PSA de los pacientes tratados con este fármaco. Esta molécula no ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (73).

- Cabazitaxel: se trata de un taxano que mejora la supervivencia en aquellos enfermos que progresaron tras tratamiento con Docetaxel. Presentó una media de aumento de supervivencia global de 15.1 meses frente a 12.7 en el grupo de Mitoxantrona y también mejoró la supervivencia libre de progresión. Debería ser administrado por médicos con experiencia en el manejo de neutropenia y sepsis, siendo recomendable el uso de forma profiláctica de factor estimulante de colonias de granulocitos (74).
- Radium 223: se trata de un medicamento específico de la enfermedad ósea metastásica que mejoró la supervivencia en pacientes con CPRC sintomático que no eran candidatos a Docetaxel o que habían progresado al mismo. El aumento de supervivencia llegó a 3.6 meses y también demostró prolongar el tiempo hasta el primer evento relacionado con el esqueleto, mejoró la calidad de vida y el dolor. Los efectos adversos se catalogaron como de gravedad moderada y estuvieron en relación a alteraciones hematológicas y diarrea (75).
- Terapia basada en el antígeno específico prostático: se trata de una terapia considerada experimental en la actualidad. El uso de PSMA de manera diagnóstica ha permitido plantear su uso como radiofármaco al unirse con isótopos terapéuticos. El más estudiado es el Lutetio que ha formado el Lu-PSMA-617. Este radiofármaco ha ofrecido resultados prometedores en pacientes que han progresado a varias terapias. Es necesario continuar la investigación y esperar a los ensayos clínico aleatorizados (76).
- Inhibidores de la enzima poli ADP Ribosa Polimerasa: se trata de fármacos dirigidos a pacientes con déficit genético de la reparación de la recombinación homóloga. Se ha estudiado el Olaparib en comparación con fármacos que actúan en el RA (Enzalutamida, Abiraterona) en pacientes con al menos una alteración de los genes de reparación recombinante homóloga. Se ha visto una mejora significativa de la supervivencia libre de progresión radiológica. Además, la supervivencia global muestra tendencia a mejorar en pacientes con Olaparib de forma no significativa (77).

Carcinogénesis del cáncer de Próstata

La próstata es un órgano situado en la parte inferior de la vejiga compuesta por acino epiteliales envueltos en un estroma fibromuscular. El epitelio acinar se encuentra organizado en el interior de una membrana basal que contiene 3 tipos de subtipos celulares mayores: células madre, células ampliadoras transitorias y células basales; que suponen el 40% de las células epiteliales. Existe otra capa epitelial de células columnares luminales secretoras que compone el resto del epitelio(78,79). Tal y como se esquematiza en la Figura 3.

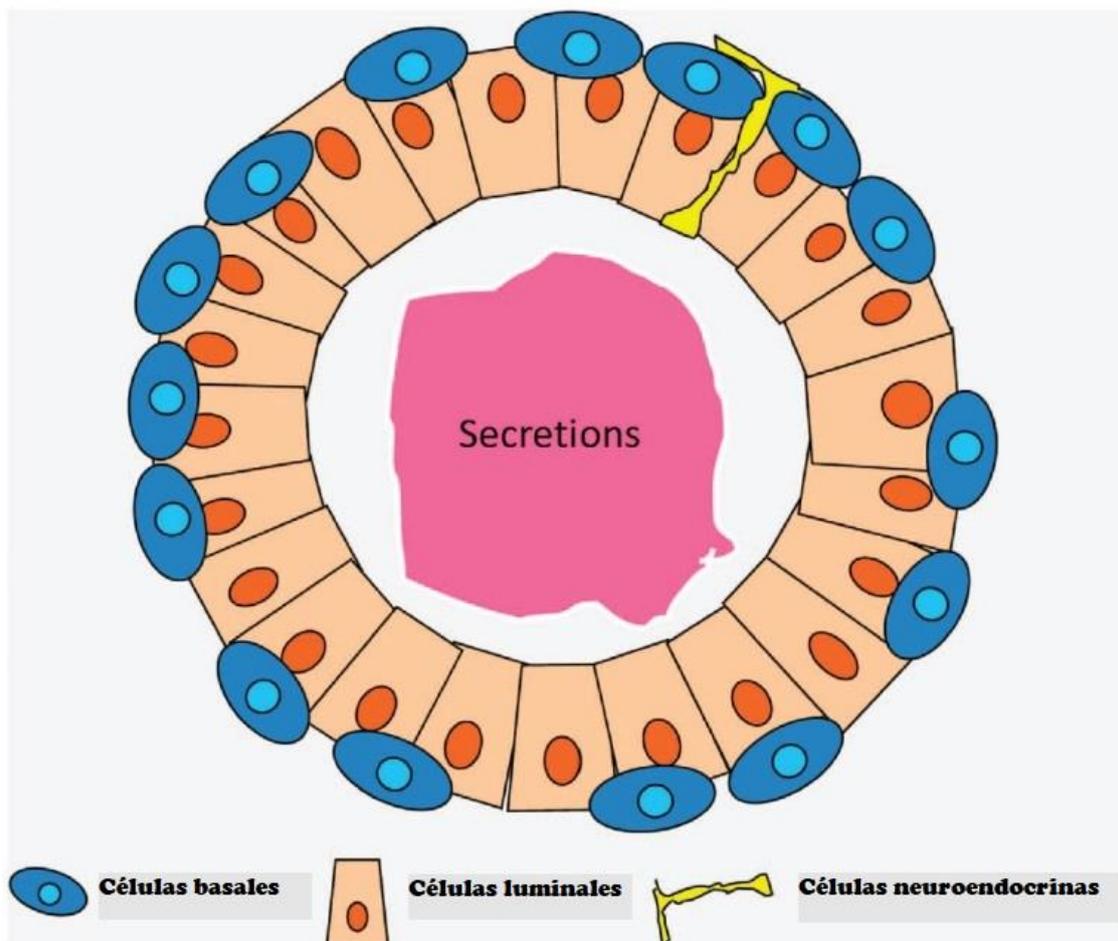


Figura 3: Modelo de acino prostático (Xin L. Oncogene. 2013).

En condiciones normales, las células madre del tejido suponen el inicio de la línea epitelial, y la división asimétrica produce una célula de transitoria amplificadora que

conduce a la formación de células basales a través de mitosis rápidas. Por último, las células basales se desarrollan en forma de célula luminal bien diferenciada, trasladándose hacia la luz acinar (80). En el CP se produce una alteración de la línea epitelial seguida de un aumento anómalo del número de células. Los carcinomas prostáticos se presentan con dominio fenotípico de las células epiteliales con alteración o desaparición de la membrana basal, y presenta estroma reactivo que ayuda al crecimiento tumoral mediante señalización heterotípica(81).

Como se ha visto, la próstata está compuesta por una amplia variedad de células: un linaje epitelial organizado, una red estromal fibro-muscular, endotelio vascular y varios tipos de células inmunes. En la mayoría de los tumores existe una diferenciación disfuncional en torno a una estirpe celular concreta. Existen 2 hipótesis que tienen en cuenta la heterogeneidad del CP:

- I. La primera es que las células malignas son consecuencia de múltiples cambios genéticos y epigenéticos sobre un único tipo celular.
- II. La segunda es que existe una célula precursora cancerosa que provoca diferenciación anómala en las células que, finalmente, originan el tumor. Ambos modelos no son excluyentes (82).

1. Modelo estocástico o de evolución clonal

En este modelo el primer cambio transformacional de la célula definitivo se produce sobre un gen oncogénico o supresor de tumores, y las mitosis sucesivas producen células con potencial de propagar el tumor. La heterogeneidad se genera a través de las mutaciones en la célula precursora del tumor. La acumulación secuencial de alteraciones genéticas en las distintas células origina la creación de variaciones del mismo clon que pueden ser seguidas hasta el evento primario (83).

La evidencia del modelo secuencial se obtiene de la observación de la carcinogénesis sobre nichos celulares predisuestos. La carcinogénesis sobre el nicho explica la proximidad espacial de los tumores multifocales primarios, donde un área de tejido representa un nicho celular con predisposición a la carcinogénesis. Cada célula del nicho presenta propensión a presentar cambios transformacionales y de establecer otros nichos con capacidad mutagénica. Se ha visto evidencia de carcinogénesis sobre nichos celulares predisponentes en CP a través de la comparación de las tasas de metilación de los genes

APC y RAR β 2 entre los tejidos benignos y malignos colindantes, señalando que existen campos epigenéticos subyacentes (84).

2. Modelo de la célula madre cancerígena

Este modelo establece la hipótesis en la que no todas las células son capaces de generar una masa tumoral tras la diferenciación maligna. Existen una subpoblación celular menor responsable del inicio del tumor, su renovación y recidiva tras tratamiento; y otra subpoblación normal que prolifera dependiente de la población de una célula madre (CM). Este grupo de células madres cancerígenas (CMCs) se encuentran en la base de una línea de células con diferenciación aberrante que resulta en variedad celular del CP; al generar diferentes líneas celulares desde la misma CMCs alterada, en sucesivas líneas de mitosis se van generando diferentes alteraciones lo que hace que el CP presente heterogeneidad celular (85).

Este modelo no excluye la teoría estocástica, ya que es posible que las CMC puedan establecer un desarrollo pre tumoral. En la fase final o en tumores agresivos es más habitual encontrar clones derivados de una CMC con una capacidad de proliferación e invasión muy potenciada que dirigirá la evolución del cáncer. Este grupo de CMC puede mantener una heterogeneidad que derivará en diversas líneas celulares cancerosas (86).

La teoría de la CMC es, por tanto, compatible con un estado intermedio en la formación del cáncer. Es en este estadio intermedio pretumoral es en el que se desarrollan todas las mutaciones sobre los genes oncogénicos que conducirán a la formación del cáncer. Estas mutaciones se irán acumulando en las CMs durante un largo periodo de tiempo. Además, la escasa rotación y la estabilidad de este grupo celular explica la baja progresión y la presentación tardía del CP (87).

La selección de mutaciones que confieran ventajas fenotípicas, en el contexto de la teoría de nichos celulares, produce un nicho de microambiente donde las mutaciones sucesivas se acumulan en una de las células. Por ello, existe una heterogeneidad en los tumores y una alta carga mutacional. De entre estas mutaciones, alguna será conductora de la formación de las primeras células cancerosas. Pero también estas CMC serán portadoras de numerosas mutaciones asociadas, que producen la heterogeneidad, y que separarán a las diferentes líneas celulares durante la evolución tumoral, de una forma neutral en su inicio. Pero durante la evolución pretumoral y durante el cáncer se acumulan y pueden conducir a la resistencia a tratamientos. Por lo tanto, se plantea un modelo en el que

predomina un desarrollo pretumoral de mutaciones frente a una evolución clonal durante el desarrollo del cáncer (87).

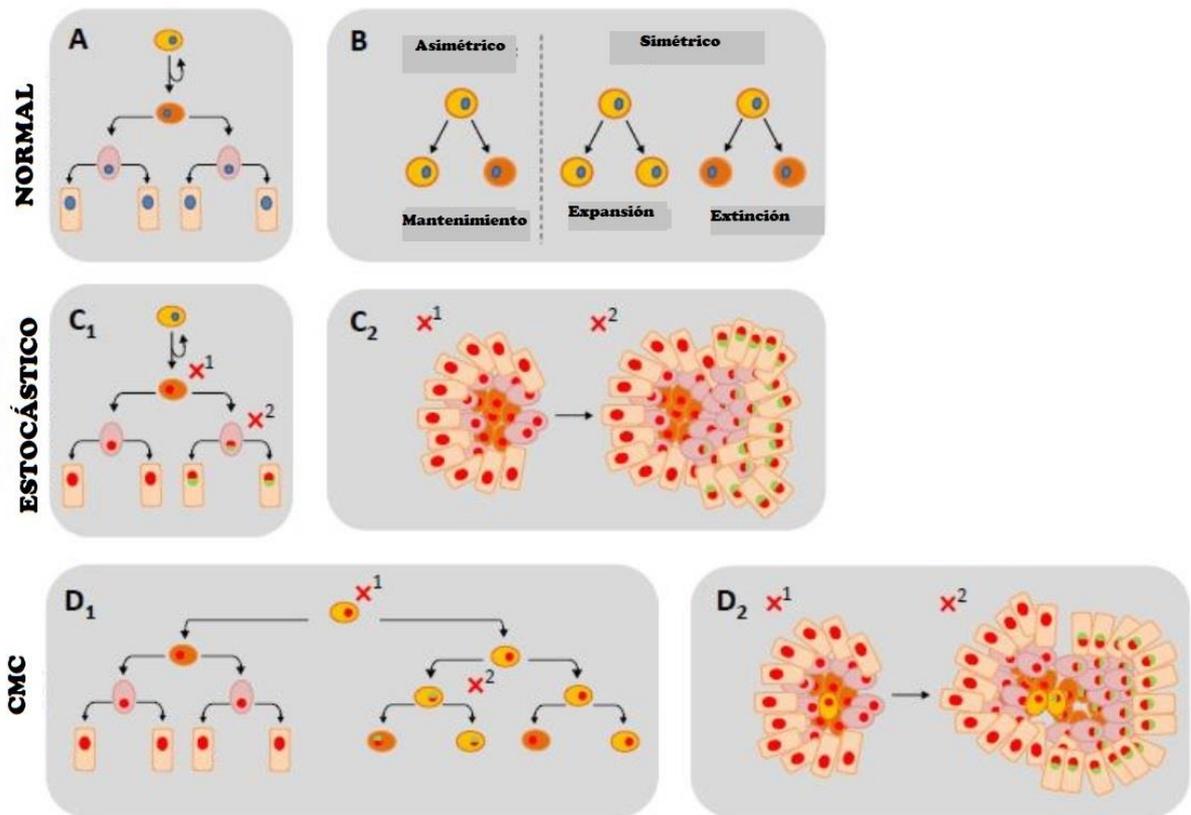


Figura 4: Modelos celulares de la génesis del CP epitelial (Packer JR et al. Molecular Cell Research 2016).

Como podemos ver en la Figura 4:

A.- Aparece el modelo epitelial simplificado. Las células luminales a través de la diferenciación por unas células de amplificación transitoria.

B.- Los resultados de la división de las CMs en un 95% de los casos ocurre de forma asimétrica, manteniendo los subgrupos de células madre y luminales. El 5% restante son divisiones simétricas o asimétricas que llevan al aumento o disminución de la población de células madre.

C.- En el modelo estocástico se produce heterogeneidad. En el diagrama C1, la primera mutación (x¹) transforma a la célula transitoria de amplificación que después produce un campo diferenciado de células basales. La segunda mutación se produce en una célula

basal que sólo puede propagarse en su línea de células basales y luminales. Estas mutaciones presentan capacidad de reproducirse y mantenerse sin perderse durante la progresión hacia la célula luminal, por lo tanto, cada célula tiene potencial para originar cáncer. En C2 se representa el modelo estocástico y la capacidad de producir heterogeneidad en base a las mutaciones descritas

D.- Modelo de la CMC. Este modelo establece que sólo la CM puede producir la primera mutación, que derive en una línea celular tumoral. La segunda mutación supone que ambos modelos, CMC y estocásticos no son excluyentes. Tras la división simétrica con la primera mutación se genera una CMC que genera un nicho donde se genera una segunda mutación en la CMC, resultando en una segunda línea celular que se diferenciará de la primera portadora de una mutación. Aparecerán 2 grupos celulares descendientes de 2 CMC una portadora de una mutación y otra línea portadora de 2(82).

3. Epigenética en cáncer de próstata

En los últimos años se ha descubierto que la epigenética de las células cancerosas está tan alterada como su genética. La epigenética permite un control flexible y plástico de la expresión de los genes a través del marcado del ácido desoxirribonucleico (DNA), que genera represión de ciertos genes; o de las histonas que activan la acetilación, ya sea para activar o reprimir genes (108,109). La regulación epigenética controla la expresión de genes, que pueden volverse desregulados en los tumores, ya sea por sobreexpresión, mutación o pérdida de las enzimas modificadoras de la cromatina; evento que ocurre de forma frecuente en el CP (110,111).

Estos mecanismos epigenéticos tienen también la propensión a silenciar alelos mutantes hasta el momento en el que se vuelven tolerables para la célula, como por ejemplo cuando las vías de control de calidad se han desregulado. La activación de oncogenes se ha evidenciado a través de la pérdida de la metilación del DNA promotor y los marcadores represores de histonas. Además, la hipometilación promotora de CP facilita la expresión aberrante de Wnt5a, que se ha correlacionado con la malignidad de la enfermedad y la utilización de esta vía por las células tumorales circulantes en la enfermedad resistente a castración (112–116).

4. Heterogeneidad en la expresión genética en cáncer de próstata

Como hemos visto el CP se desarrolla a través de alteraciones genéticas y epigenéticas. Es una característica del CP la heterogeneidad en cuanto a alteraciones genéticas en distintas poblaciones celulares dentro del mismo tumor. El mecanismo por el cual se produce heterogeneidad en el CP es que las mutaciones y alteraciones genéticas se van acumulando en las células a lo largo de la etapa pre-tumoral. Esto genera distintas poblaciones celulares diferenciadas por las alteraciones genéticas que presentan. La heterogeneidad celular dentro del tumor aumenta significativamente el potencial de seleccionar una única célula a través de la adaptación a un cambio microambiental o en respuesta a un nuevo régimen de tratamiento (117,118).

Uno de los fenómenos que más contribuye a la heterogeneidad en CP es la expresión monoalélica aleatoria (EMA) que consiste en que distintas células tienen variantes alélicas preferidas. Este fenómeno es distinto al establecido por la metilación de los promotores, o de la delección en ciertos locus detectada en el cáncer.

La EMA consiste en un único alelo que se mantiene en el tiempo, a través de la división asimétrica y la mitosis. La fijación de la expresión monoalélica (EM) hace que las células resultantes se diferencien del resto que se encuentra en el tejido, creando un mosaico de expresión celular (120,121).

Se ha visto que la EM no está controlada por la metilación correlativa a las islas CpG promotoras como se pensó inicialmente. La metilación específica de hebras podría causar cambios en los alelos activos en la mitosis, aunque los análisis recientes de mayor resolución han determinado que la EMA está definida por una firma asimétrica en la cromatina en las que las histonas del cuerpo del gen del alelo activo están trimetiladas en H3K36 y el alelo silenciado en H3K27 como se puede apreciar en la Figura 4A. Esta característica es predictiva de EMA.

Se ha visto que los genes estructurales de la cromatina incluidos en la EMA también se encontraban de forma bivalente en células tumorales. La cromatina bivalente está formada por la disposición de la histona activadora H3K4me3 y la represora H3K27me3 modificadas en la región promotora, lo que permite una activación rápida de genes. Por tanto, los genes bivalentes como aquellos de la EMA, están involucrados en cáncer en varios tejidos. Se puede apreciar en la Figura 4B (122,123).

La anomalía genética más habitual en CP es la unión TMPRSS2-ERG está regulada por la profusión por EMA. A través de la recombinación con el gen ERG, el alelo fusionado se convierte en dominante al expresarse de forma monoalélica. La supresión del TMPRSS2 no fusionado se aumenta durante el desarrollo, con la aleatorización de la expresión alélica fuera del núcleo. Esta alteración genera plasticidad epigenética en la célula propagadora y resulta en heterogeneidad en la expresión celular como se puede ver en la figura 4 C (124,125).

La EMA tiene la capacidad de silenciar genes supresores de tumores y permitir la expresión selectiva de alelos oncogénicos. Seguramente los alelos tumorales se silencian durante el desarrollo pretumoral y luego se ven reactivados. Esto puede generar situaciones de penetrancia variable y por tanto contribuir a la heterogeneidad del CP (116).

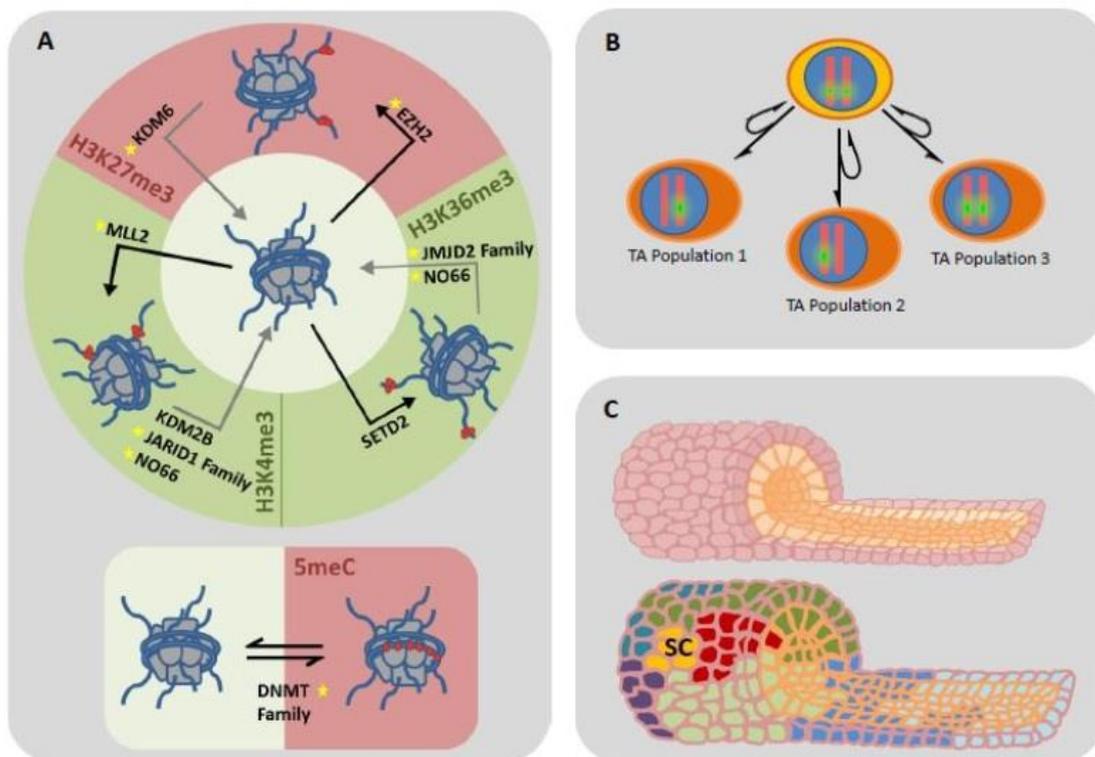


Figura 5: Epigenética y patrones de tejido en la EMA. (Parker JR, Norman J.Maitland. BBA Molecular Cell Research. 2016).

5. Inflamación prostática como vía de carcinogénesis

La etiología inflamatoria del CP ha sido estudiada a lo largo de los años. La inflamación secundaria a la infección estimula la infiltración por células inmunes. La secreción de citoquinas en este ambiente tiene la capacidad de transformar las células. Se han identificado genes inflamatorios involucrados en la carcinogénesis prostática como puede ser la activación de NF-kB, interleucina -6 (IL6) y IFNGR1 (126).

El aumento sérico de IL-6 es habitual en los pacientes con CP avanzado. La secreción de IL - 6 por parte de las células tumorales genera un bucle autocrino, ya que estas células presentan receptores para la IL - 6. La activación STAT 3 actúa como una alternativa a la dependencia androgénica en el tratamiento con bloqueo androgénico (127,128).

Mientras que la infección permanente inicia un aporte exógeno de IL-6 por parte de los linfocitos y macrófagos de forma primaria, el aumento de IL-6 en el nicho promueve un cambio adaptativo en las células que luego se manifiesta como una señalización de retroalimentación positiva. La activación de una célula por el aumento de citoquinas garantiza una ventaja selectiva en el nicho inflamatorio. El aumento de IL-6 sérico por parte de las células no tumorales podría generar un factor más para la expansión y supervivencia de las células madre tumorales metastásicas en el CP. (129,130).

Las células estromales también contribuyen a la carcinogénesis e incluso se vuelven reactivas durante la neoplasia intraepitelial (PIN). La señalización entre el estroma y el epitelio se altera en el cáncer, y el músculo liso estromal habitual es reemplazado por fibroblastos que se activan a miofibroblastos, transición habitual en las localizaciones con heridas y remodelado tisular. La expresión de los ligandos en la red extracelular, como el aumento de los niveles de colágeno 1, también se ve en el cáncer. La sobreexpresión de TGF- β se ha visto que produce estroma reactivo, también visualizado en las lesiones PIN de alto grado. La producción de citoquinas por parte del estroma puede producir efectos sinérgicos en la señalización TGF- β para aumentar el epitelio tumoral. Las mismas citoquinas están involucradas en la invasión, metástasis e infiltración inmune del tumor primario (131,132).

La presencia de células inmunes en el tumor puede llevar de forma paradójica a la progresión carcinogénica (133). Los linfocitos T que se infiltran se encuentran a menudo silenciados, como muestra la expresión de PD-1. La presencia de macrófagos asociados a un tumor se ha relacionado con un aumento de recurrencia bioquímica, aunque un

aumento del nivel de células *natural killer* se ha asociado con menos probabilidad de progresión de la enfermedad (134). Los linfocitos B se elevan en los tumores y pueden activar la transcripción Bmi-1 en las células cancerosas a través de la vía NF- κ B, contribuyendo al proceso de autorregeneración. El tejido dañado en la próstata, seguido por el influjo de las células inmunes, produce un medio de citoquinas y factores de crecimiento que puede potencialmente causar la transformación de las células madre epiteliales (135).

6. Lesiones premalignas y cáncer de próstata

Los modelos de carcinogénesis actuales están asociados a la existencia de un estado premaligno activado. La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) es la lesión premaligna más frecuente y supone la mayor vía precancerosa de la próstata (136). Está caracterizada por una hiperplasia de las células luminales, y está bioquímica, genética y fenotípicamente emparentada con el CP, aunque sin llegar a provocar la rotura de la membrana basal (137). La tasa de mitosis en las células en la bicapa epitelial está limitada en PIN y se produce un aumento de la población celular secretora, siendo la antesala de la diferenciación aberrante en el CP. Se ha visto coincidencias en algunos estudios entre las células de PIN y el CP. Los perfiles de expresión de las células PIN y el CP tienen mayor congruencia que cualquier perfil celular de los observados durante la progresión de la enfermedad.

Existen estudios que han demostrado que las PIN de alto grado son carcinomas retrógrados que han invadido glándulas normales. A través de alteraciones de TMPRSS2-ERG se ha seguido las lesiones cancerosas con PIN de alto grado adyacentes y se ha visto pérdida del gen homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN) en subpoblaciones, que se utilizó como marcador de progresión molecular en el cáncer. La identificación de la supresión PTEN en PIN de alto grado se demuestra que la histopatología era en realidad cancerosa. Esto sugiere que PIN tiene efectos iniciadores de cáncer, incluyendo la fusión TMPRSS2-ERG, la mutación SPOP y la pérdida NKX3.1 lo que sugiere que puede haberse secuenciado células cancerosas que imitaban PIN en el estudio anatomopatológico (138–140).

7. Mutaciones conductoras y pasajeras en carcinogénesis

Las mutaciones son la vía más habitual de transformación de una célula normal y de heterogeneidad intratumoral. Con la llegada de la secuenciación de nueva generación, el

reconocimiento de las vías de proliferación mutacionales del cáncer ha permitido la identificación de las vías y genes alterados de forma recurrente en los diferentes tipos de cáncer. Las mutaciones conductoras están definidas, así como aquellas que confieren una ventaja proliferativa de la célula. Sería esperable que los cambios comenzaran en las células precursora del cáncer como una parte de la progresión premaligna. Sin embargo, los estudios de secuenciación revelan una mayor carga de mutaciones, a las que se les llama mutaciones pasajeras; se definen como aquellas que no producen ningún beneficio evolutivo pero que se encuentran seleccionadas junto con las conductoras que confieren ventaja. Aunque, por otro lado, dichos cambios pueden convertirse en adaptativos ante la presión de un tratamiento (141).

Los cambios epigenéticos también pueden volverse conductores ya que permiten cambios mutagénicos y plasticidad celular y, de la misma forma, facilitan una respuesta adaptativa en caso de la agresión de un tratamiento. También se encuentra evidencia de progenitores epigenéticos de cáncer en los que los cambios cancerígenos no son mutaciones fijas sino cambios sutiles de los niveles de expresión de ciertos genes (142,143).

La teoría de la carcinogénesis paso a paso es parecida al modelo de evolución clonal, lo que implica una mutación conductora iniciadora que permite que la célula primaria inicie la neoplasia desde un campo predisponente. Las células del campo pueden sufrir mutaciones selectivas que ocasionen regeneración clonal premaligna y proveer la adquisición del número de mutaciones conductoras mínimas para la formación de la primera célula tumoral. El primer modelo de carcinogénesis proponía la capacidad metastásica como una adquisición final, pero estudios recientes afirman que la metástasis puede ocurrir incluso en estadios precoces de la progresión, pero que permanecen indetectables por la ineficacia de dichas células, el desarrollo requiere fenotipos adaptativos al tejido donde se siembre la célula metastásica; lo que puede originar micrometástasis latentes. Esta transformación precoz epitelio- mesenquimal puede estar estimulada por la invasión inmune del tumor primario, hecho que ocurre con frecuencia en el CP (81).

Otra crítica al modelo lineal es que, si las mutaciones ocurriesen de forma secuencial las células serían eliminadas por el sistema inmune ante la falta de alteración en las vías de la apoptosis. La acumulación de mutaciones conductoras en el desarrollo pretumoral no serían expresadas por las células madre afectadas hasta que se eliminase las vías de señalización que resultan en muerte de las células cancerosas (81).

El número de eventos conductores que separa una célula normal de una célula cancerosa suele ser dependiente del tejido, en el caso de la próstata se ha visto que entre 1 y 3 mutaciones específicas son necesarias para la carcinogénesis en el modelo animal.

7.1 Alteraciones genéticas y epigenéticas en cáncer de próstata

Los tumores prostáticos se diferencian de la mayoría de los tumores sólidos en que favorecen el realineamiento genético en vez de mutaciones clave puntuales. Este cambio en el genoma de la próstata ocurre de una forma organizada y coordinada a través de eventos encadenados. Dicho fenómeno se acumula a través de un tiempo prolongado dando como resultado la aparición clonal de las alteraciones fundamentales: fusión TMPRSS2-ERG y delección NKX3.1 y la aparición subclonal de alteraciones tardías como la supresión de PTEN y del gen del inhibidor de la quinasa dependiente del ciclo (CDKN1B). Las deleciones en los genes supresores de tumores clásicos como RB1 y p53 también se observan en el CP, pero en tumores más avanzados. Seguramente en los tumores prostáticos la alteración de los mecanismos de reparación de DNA facilita la reorganización del genoma lo que constituye la aparición de células tumorales (126,144).

La secuenciación del CP ha identificado un grupo de eventos que altera la regulación de las enzimas modificadoras de la cromatina. La histona-lisina metil transferasa (EZH2) se encuentra sobre activada y amplificada en los tumores avanzados. EZH2 puede ser activada por ERG y se ha mostrado que influencia la dediferenciación celular, a través del silenciamiento de los genes críticos como NKX3.1 (145).

También se ha encontrado la mutación recurrente de histona-lisina N-metiltransferasa MLL2, otra metiltransferasa H3 que interactúa y facilita la activación del RA. Estas enzimas están involucradas en el mantenimiento de la cromatina bivalente, donde las metilaciones dobles de las histonas marcan un conjunto de genes que ven afectada su regulación durante el desarrollo de CP. Muchas metiltransferasas y demetilasas también se ven alteradas en la enfermedad lo que afecta a la transcripción de los genes objetivo. Se puede concluir que los eventos epigenéticos específicos juegan un papel en la carcinogénesis del CP, aunque los cambios epigenéticos durante el desarrollo sólo han comenzado a descubrirse (146,147).

8. El papel de los andrógenos en el inicio del cáncer de próstata

La formación neonatal de la próstata está dirigida por los andrógenos, así como su crecimiento durante la pubertad, lo que representa una respuesta proliferativa nativa. La mayoría de las células prostáticas expresa RA, aunque sólo las células luminales dependen directamente de las hormonas para su supervivencia. La expansión de la capa celular luminal en PIN y en el CP implica que el RA es importante en el desarrollo de la enfermedad. Además, la castración farmacológica mediante el bloqueo del eje androgénico ha sido un tratamiento efectivo para disminuir el crecimiento tumoral durante los últimos 70 años (99,152).

Los andrógenos han demostrado inducir la fusión TMPRSS2-ERG a través de la activación transcripcional de RA en las células productoras de CP. Este mecanismo se realiza a través de la interfase y colocación de ambos *loci* que se fusionan con el reclutamiento de topoisomerasa II. La creación de la fusión es un evento fundamental para establecer un perfil ERG inapropiado que genera un estado indiferenciado e independencia androgénica de las células cancerosas (153).

Las alteraciones del propio RA se han estudiado después del tratamiento a través de la amplificación del locus, mutación y alteración del *Splicing*. Estas modificaciones llevan a la activación del RA, aunque existan niveles androgénicos de castración. El CP es portador de mutaciones frecuentes y cambios de expresión de las proteínas reguladoras de RA como la proteína de tipo moteado POZ (SPOP), coactivadora de receptor nuclear (NCOA2), la proteína con cabeza de tenedor tipo A1 (FOXA1), MLL2 y proteína de anillo dedo (RNF6). Esto subraya la importancia de la señalización androgénica en la evolución de las células luminales cancerosas de la próstata (154,155).

El bloqueo androgénico es en su inicio un tratamiento efectivo y provoca involución de la próstata normal y reducción en la masa tumoral, pero es casi inevitable que falle a largo plazo. La resistencia a castración ocurre en cada paciente. Seguramente el RA se modifica mediante la mutación y amplificación en pequeños grupos subclonales antes del tratamiento, y se convierten en predominantes después de la recidiva, pero estas alteraciones son raras en cáncer sin tratamiento hormonal previo (156).

Los niveles de castración seleccionan células con alteraciones del RA que hacen un inicio rápido del recrecimiento tumoral tras tratamiento hormonal (99).

9. Reparación de DNA y defectos en la respuesta a DNA dañado

La inestabilidad genómica está considerada la antesala al cáncer y permite el aumento de la tasa de mutaciones que puede tanto predisponer como acelerar el desarrollo de cáncer. El acortamiento de los telómeros, y el defecto en la respuesta y reparación del DNA dañado contribuye a la inestabilidad y supone un peor pronóstico en el CP (157).

El CP presenta una respuesta deficiente al DNA dañado, aunque los fenotipos con este tipo de mutaciones se suelen presentar tras recibir tratamiento. Estudios poblacionales han mostrado que varias alteraciones sobre genes predisponen al CP. Mutaciones del gen de la susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA) 1- 2, el gen de serina/treonina quinasa (AKT) 2, el gen poli ADP ribosa polimerasa (PARP) 1, el gen de la proteína complementaria de la reparación de rayos X (XRCC1) y el gen de la ataxia telangiectasia mutado (ATM) aumentan el riesgo de CP. Otros defectos en el control del DNA han sido observados en tumores esporádicos avanzados como las alteraciones de ATM y p53 (158–160).

El estrés replicativo a través de la AKT (activación de la replicación a través de la pérdida de PTEN) y MYC producen desestabilización del genoma. AKT aumenta la recombinación no homóloga (NHEJ) que en el CP sirve para originar realineamientos mutagénicos. RA es dependiente de PARP1 para generar su transcripción y el receptor nuclear androgénico también responde al daño del DNA, facilitando la expresión de XRCC2 y XRCC3 que funciona en la reparación por recombinación homóloga a través de la sobreexpresión de DNA-PKCs, una enzima fundamental en NHEJ (161,162).

Marcadores genéticos en cáncer de próstata

MicroRNAs

Los micro RNAs (miRNAs) son moléculas de ácido ribonucleico (RNA) no codificante que contienen entre 18 y 22 nucleótidos. Tiene como función regular la expresión genética tras la transcripción. Se describieron por primera vez en 1993 en *Caenorhabditis Elegans* pero pasaron desapercibidos hasta 8 años más tarde cuando se encontraron en otras especies (139,140).

Su síntesis comienza en el núcleo cuando los genes que cifran los miRNAs son transcritos a través de la RNA polimerasa II, y generan transcritos primarios, conocidos como pri-miRNAs. Dichos pri-miRNAs son separados por las enzimas Drosha RNAasa III (ribonucleasa) y la proteína de unión al RNA DGCR8. De la separación de pri-miRNA aparecen estructuras de 85 nucleótidos llamados pre-miRNAs. Existe un transporte desde el núcleo al citoplasma llamado complejo Ran/GTP/Exportina 5 que facilita el paso de pre-miRNA, y una vez transportados es catalizado por la enzima RNAasa III *Dicer* que genera una molécula de miRNA doble con 20 a 22 nucleótidos. Este complejo regula el silenciamiento genético a través de la degradación del RNA mensajero (RNAm) o la disminución de la traducción dependiendo de si el miRNA y el RNAm diana son complementarios (139). En la figura 6 aparece la formación y mecanismo de acción de miRNAs.

La represión génica se realiza mediante la unión el miRNA a la región 3' no traducida (3'UTR) del RNAm y también a la región 5' no traducida (5'UTR). En un principio se creyó que sólo silenciaban la expresión genética, pero se ha visto que es posible que los miRNA funcionen como ligandos para adherirse al receptor tipo Toll (TLR), lo que inicia las vías de regulación (139).

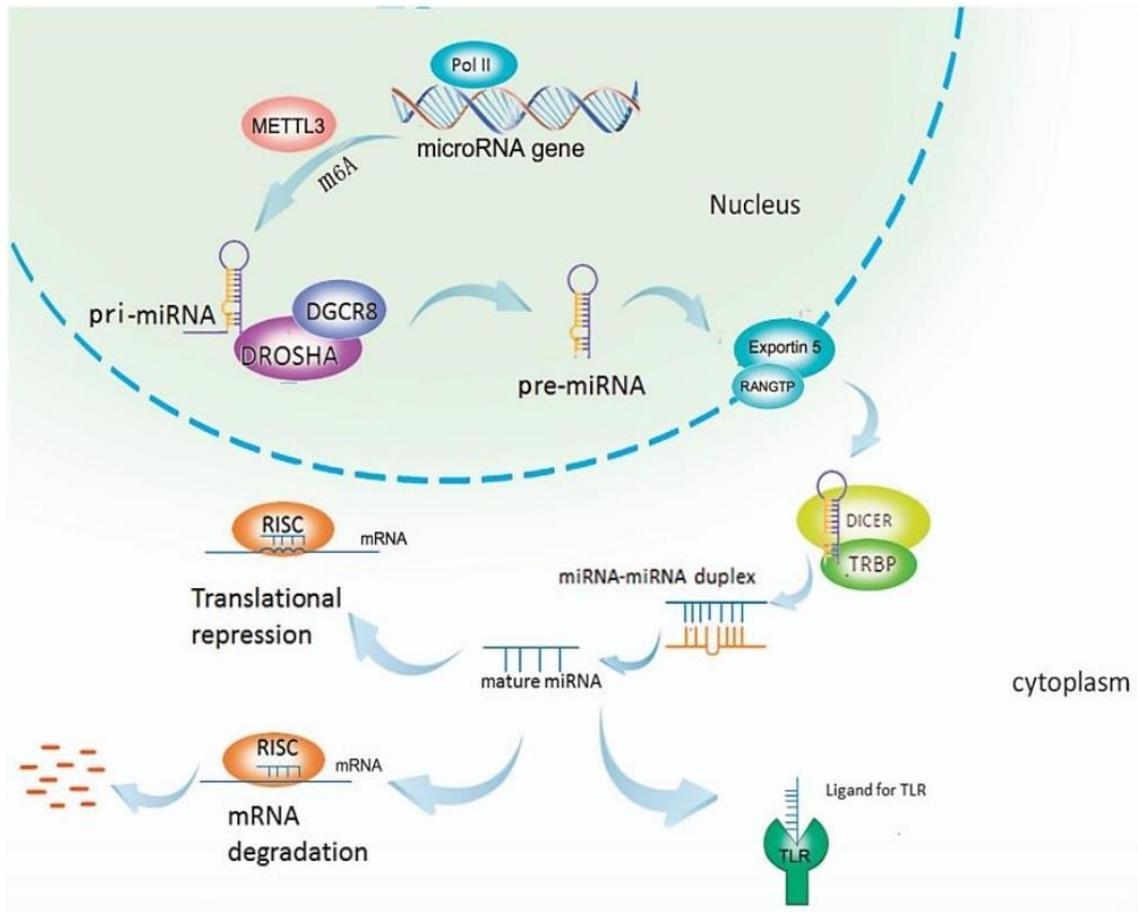


Figura 6: Síntesis y mecanismo de acción miRNA. (Peng Y et al. *Signal Transduct Target Ther.* 2016).

Es posible que hasta un 60% de los RNAm se encuentren regulados por miRNAs. Cada miRNA puede manejar la expresión de varios RNAm que pueden pertenecer a la misma vía de señalización o a otra. Los miRNAs por tanto modifican varias vías implicadas en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis, y la alteración de su expresión es posible que concluya en la aparición de cáncer (140).

1. miRNAs y cáncer

En el cáncer se han visto diversas alteraciones de la expresión de miRNAs. Existen alteraciones en la expresión de miRNAs que podrían ser consecuencia de la alteración de los genes que codifican dichos miRNAs. Por otro lado, podrían ver alterada su expresión a través de mecanismos epigenéticos, ya que los miRNAs se sitúan próximos a las islas CpG que son omitidas por la metilación del DNA y por alteraciones en la generación de miRNAs. Además, la alteración en la expresión podría ser debida a la mutación de las enzimas que forman parte de la síntesis o a la función aberrante de los factores de transcripción; por ejemplo, el factor de transcripción p53 que regula parte del ciclo celular

y la apoptosis está alterado en el 50% de los tumores. P53 regula la expresión de diversos miRNAs como el grupo miR-34. Se ha visto que la expresión de miR-34 se reduce en cáncer de ovario, colon o próstata donde el RA regula su transcripción a través de miR-34 (140,141).

Los miRNAs involucrados en patogénesis cancerígena pueden regular tanto genes supresores de tumores como oncogenes. La sobreexpresión de miRNAs puede actuar como onco-miRNAs y reprimen genes supresores de tumores. Por otro lado, los miRNAs silenciados en un proceso tumoral, deben de funcionar como reguladores de genes supresores de tumores. La función de los miRNAs en la carcinogénesis varía en función del ambiente en el que se localice, de esta forma un miRNA puede verse sobre-expresado en algún tipo de tumor y suprimido en otro; un ejemplo de ello es el miR-29 que actúa sobre-expresado en el cáncer de mama y como inhibidor de tumores en los tumores de pulmón (140).

Los miRNAs pueden ser utilizados como biomarcadores debido a su sencillez, su estabilidad y resistencia al ambiente de almacenamiento y ser accesibles. Se encuentran en tejido, fluidos como la sangre, semen, lágrimas, leche materna u orina. También han sido hallados en las vesículas extracelulares como microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas. Son capaces de formar complejos asociados a proteínas argonauta y son liberados en un 90% en fluidos biológicos. Por último, son detectados fácilmente y cuantificables a través de técnicas estándar empleadas de forma habitual como microarray o la PCR cuantitativa a tiempo real (142).

2. Participación de miRNAs en la carcinogénesis del cáncer de próstata

Los miRNAs son fundamentales en el CP a través del control de la expresión de proteínas de señalización de ciclo celular, apoptosis, la regulación del RA, en la transición epitelio mesénquima (EMT) y formación de metástasis como se puede visualizar en la Figura 7 (143).

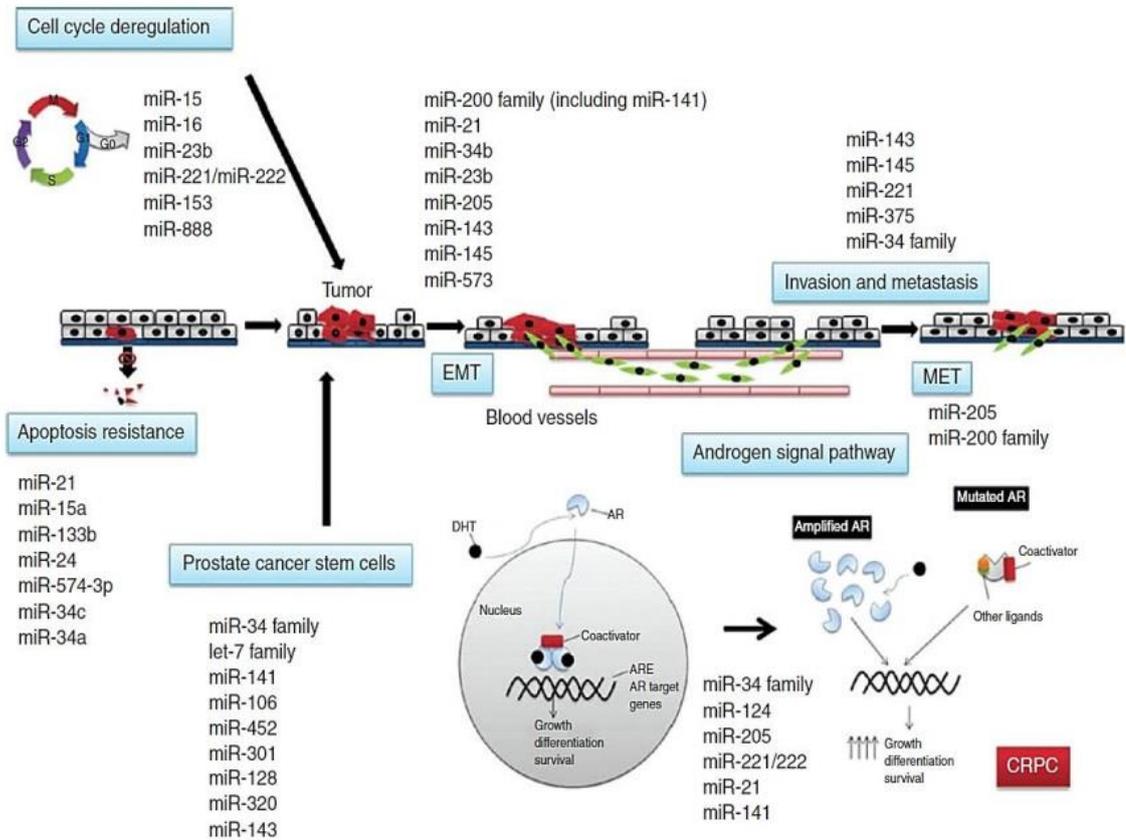


Figura 7: Función de los miRNAs en el CP (Filella X et al. Clin Chem Lab Med. 2017).

Existe una amplia variedad de miRNAs involucrados en la regulación del RA como, por ejemplo: miR-31, miR-21, miR-141 y miR-34; y a su vez el RA puede regular la función de algunos miRNAs como son: miR21-, miR-27a, miR-34, miR-125b, miR-221 y let-7 (143).

El grupo miRNA-200 formado por miR-200a, miR-200b, miR200c, miR-141, miR-429, miR-573 y miR-375 participan en el proceso de EMT (transición epitelio mesénquima) a través de la supresión de biomarcadores mesenquimales y el control positivo de los parámetros epiteliales. La conversión de epitelio-mesénquima hace posible que las células epiteliales polarizadas asuman un fenotipo mesenquimal que concede un aumento en la facultad de la invasión, migración y por tanto de formar metástasis (143).

Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos miRNAs alterados en el CP y de su función en la regulación de ciertos genes podría ser de utilidad. Puede plantearse el uso de miRNAs

como biomarcadores ya sean diagnósticos, pronósticos o de respuesta al tratamiento durante la enfermedad.

El grupo de Schaefer A *et cols* realizó un estudio para asociar los miRNAs con el diagnóstico de CP. Se compararon tejido prostático canceroso frente al tejido sano colindante y se demostraron 15 tipos de miRNAs que se expresaban de forma diferente como: miR-16, miR-31, miR-125b, miR-45, miR-149, miR-181b, miR184, miR205, miR-221 y miR-222 que fueron silenciados; y miR-96, miR-182, miR-182, miR-183 y miR-375 se sobrepresaron. La supresión de miR-16 podría intervenir en fenómenos de escape a la apoptosis, ya que se ha visto que su reconstitución conduce al control del crecimiento tumoral. La supresión de miR-31 se había observado en otro tipo de tumores como el cáncer gástrico. En el caso de miR-96, ya se había visto sobrepresado en la leucemia mieloide crónica y la hepatocarcinoma. Además, el aumento en la expresión de miR-96 se ha asociado a aumento en la escala de Gleason y con el aumento de recidiva bioquímica tras tratamiento. (144).

Existen estudios que focalizan su atención a la diferenciación de paciente con CP e hiperplasia benigna de próstata (HBP) con el objetivo de diferenciar ambas enfermedades a través de la utilización de miRNAs, con el objetivo de evitar biopsias prostáticas innecesarias. Investigaciones realizadas por Sharova E *et cols* reflejaron una pauta de miRNAs en plasma en hombres con PSA aumentado en 2 grupos de pacientes con biopsia con CP localizado y HBP. Estos estudios demostraron que la proporción miR-106a/miR-130b y miR-106/miR-223 fueron significativamente diferentes entre ambas cohortes; siendo más específicos y sensibles que el PSA para diferenciar entre ambas patologías (145,146).

También se han realizado estudios de expresión de miRNAs para evaluar el grado de agresividad de la enfermedad o para predecir el riesgo de recaída. Se realizó un grupo compuesto por miRNAs circulantes miR-378*, miR-375 y miR-141 y se ha descubierto un aumento de la expresión con la evolución del tumor; y miR-409-3p se ha visto sobrepresado en los hombres de alto riesgo frente a los de bajo riesgo. Los miRNAs: miR-21, miR-200a, miR-145, miR30d, miR-301a, miR449b y miR-182 se han analizado en el tejido y se han asociado a recurrencia bioquímica tras prostatectomía (147,148). En la Tabla 7 se ven los diferentes miRNAs relacionados con el pronóstico en CP.

Tabla 7: Marcadores estudiados en el pronóstico del CP (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 (n = 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 (n = 25) and age-matched HD (n = 25)	Metastasis	6 deregulated	miR-141	↑
Brase et al. (2011) [100]	Serum samples from localized PCa (n = 14) and metastatic PCa (n = 7)	Metastasis	5 upregulated	miR-141, miR-375	↑
Bryant et al. (2012) [48]	Serum samples from PCa (n = 72) and metastatic PCa (n = 47) Plasma samples from PCa (n = 55) and metastatic PCa (n = 24)	Metastasis	2 upregulated	miR-141 and miR-375	↑
Nguyen et al. (2013) [103]	Serum samples from localized PCa (n = 58) and metastatic CRPC (n = 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 (n = 20), ADPC (n = 20), CRPC DTX treated (n = 10) and BPH (n = 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.

3. Selección de miRNAs como biomarcadores

La selección de los miRNAs para los estudios se ha basado en su relación con la carcinogénesis y con la agresividad tumoral. En este sentido el miR-93-5p, combinado con otros miRNAs como miR-17-5p, miR-201-5p y miR-92a-3p; han sido seleccionados como uno de los marcadores con potencial en el CP. miR-93-5p regula la acción de varios

genes como el gen del factor de transcripción E2F2, el gen de la subunidad M2 de la ribonucleósido-difosfato reductas (RRM2) y el gen de la proteína quinasa asociada a la tirosina/treonina de la membrana (PKMYT1). Además, miR-23c ha sido estudiado como un marcador de predicción de recurrencia en el CP, a través de la regulación de RGN (gen Regucalcin). RGN promueve el periodo silente en CP. Además, el miR-23c ha sido descrito como un inhibidor de la proliferación celular y promotor de la apoptosis a través de la atenuación de ERBB2IP (proteína de interacción erbb2) (149,150).

En el caso de miR-210-3p se ha incluido como un posible marcador no invasivo en relación al diagnóstico y tratamiento en el cáncer renal de células claras. En el CP se han visto resultados en los que la sobreexpresión de miR210-3p activa la vía de señalización NF-kB, que se ha relacionado con las metástasis óseas en CP. Además, se ha visto que la vía de señalización miR-210-3p-EphrinA3-PI3K/AKT tiene un rol principal en el pronóstico y tratamiento del carcinoma escamoso oral. En estudios de semen de pacientes con CP se ha descubierto la importancia de exo-oncomiR-221-3p, miR-222-3p y TWEAK como biomarcadores de clasificación de agresividad en CP. Por último, se ha visto que miR-221-3p está relacionado con el éxito en la respuesta a quimioterapia cáncer de mama (151,152).

La desregulación de miR-592 ha sido descrita en otros tumores como el melanoma uveal, el carcinoma renal de células claras, carcinoma colorrectal y el cáncer de estómago. Se ha evidenciado la interacción directa con los genes implicados en la migración, motilidad y desarrollo celular. Hay muchos aspectos que indican que miR-592 tiene interés como marcador de agresividad, pronóstico y tratamiento en cáncer renal de células claras. La sobreexpresión de miR-592 parece que promueve la proliferación, migración e invasión del cáncer renal de células claras a través de la regulación de SPRY2, gen que se ha visto relacionado con las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/EPK. En el CP existe evidencia que relaciona miR-592 con la agresividad en combinación con ANPEP, miR-217 y miR-6715b (153–155).

Una de las primeras proposiciones de cribado de CP con miRNAs circulantes fue centrada en el cociente entre varios miRNAs como miR-106a/miR-130b y miR-106a/miR-223; que se relacionaron por la discriminación CP localizado frente a HBP. Aunque existen más razones que relacionan miR-130b con el CP, como el cociente miR-130b/miR-301b; que se ha relacionado con agresividad, estadio TNM, tumor residual tras tratamiento y respuesta a terapia inicial. La función de este miRNA en la carcinogénesis está descrita

por el efecto en la represión de MMP2 (metaloproteinasa-2), el cual tiene un efecto supresor de metástasis en CP. Además, estudios recientes han descubierto un objetivo terapéutico antiangiogénico a través de la correlación de la retroalimentación miR-130b/TNF- α /NF-Kb/VEGFA con la angiogénesis en CP (156,157).

3.1 miR-375 y miR-141

miR-141 y miR-375 están siendo estudiados como los miRNAs más útiles para el pronóstico y diagnóstico de CP. En ambos casos se sobreexpresan en el tejido del CP en comparación al tejido normal (158). Podrían llegar a ser útiles para identificar tumores localizados con respecto a los metastásicos, ya que en un análisis de los pacientes con CPRCm presentaban mayores niveles de estos miRNAs en el suero en comparación con CP de bajo riesgo (147). En otro estudio realizado por Rönnau CGH *et cols* se vieron resultados similares comparando pacientes metastásicos con aquellos no metastásicos, ya que los niveles de miR375 y miR-141 se vieron elevados en los primeros. También se vio un aumento en la expresión de ambos miRNAs en aquellos tumores con mayor puntuación en la escala de Gleason (159).

miR-141 forma parte de la familia miR-100 que se une a miR-200c y se encuentran localizados en el cromosoma 12. Este miRNA regula la actividad de transcripción de proliferación celular y de RA a través del silenciamiento de Shp, un co-represor del RA. Existen estudios que indican que regula la EMT silenciando la expresión de marcadores mesenquimales como ZEB1 y VIM; facilitando la expresión de marcadores epiteliales y hallándose sobreexpresado en tumores metastásicos (147,148,160).

En el caso de miR-375 se halla en el cromosoma 2 entre los *locus* de los genes CRYBA2 y CCDC108. Aunque su expresión está habitualmente aumentada en el CP, no se ha encontrado claramente su función. Se ha visto que el aumento de miR-375 en células PC3 del CP promueve la formación de marcadores epiteliales, silencia la expresión de marcadores mesenquimales y reprime la invasión *in vitro*. Por otro lado, ZEB1 inhibe la expresión de miR-375 y miR-375 podría tener funciones promotoras del ciclo celular. Se ha visto que miR-375 aumenta en tejido tumoral prostático de forma proporcional a la inhibición de mRNA Sec23A teniendo como resultado un aumento de la proliferación celular frente a muestras de tejido que no presentaban adenocarcinoma prostático. Se ha relacionado con el estadio clínico TNM, las metástasis óseas y la diferenciación de paciente con CP de aquellos que no lo presentan (147,155,159,161).

3.2 Controles endógenos para estudio de miRNAs en CP

A la hora de evaluar la expresión de miRNAs se realiza con un análisis de RT-PCR (*Real Time PCR*). Dicha técnica puede producir variaciones entre las reacciones de las diferentes etapas del proceso, como, por ejemplo, en el análisis de las muestras, en el método de extracción del RNA, su optimización o en la efectividad del proceso de retrotranscripción. Los resultados deben normalizarse a través de un gen de control endógeno durante el análisis, llamado *housekeeping* o normalizador. Los patrones de expresión de una gran parte de RNA se modifican según la clase de célula y el ambiente, y por tanto no hay un gen endógeno común de control. Dependiendo del tejido se selecciona un gen de control específico para las muestras de dicho tejido. Este control endógeno debe ser estable porque si no puede llevar a resultados poco fiables (142,162).

El rRNA 18s y el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y han sido tradicionalmente utilizados como genes normalizadores en RT-PCR. Los RNAs nucleolares pequeños también son usados como controles de estudios de miRNAs. Uno de ellos es RNA nucleolar pequeño llamado RNU6B, que es uno de los controles endógenos con más utilidad para la evaluación de los patrones de expresión de miRNAs; y más concretamente para el análisis de tejidos prostáticas. También el miR-130b o el RNU24 puede ser empleados para el estudio de los patrones de expresión de miRNAs en el tejido del CP; aunque se ha visto que pueden ser inestables ya que muestran variabilidad en la expresión entre tejidos. Por otro lado, miR-130b puede tener como propiedad ser un miRNA silenciador de tumores en CP, por lo que su expresión se reprime en el tejido y células de CP (162–164).

SNPs

Tras la secuenciación del genoma humano se llegó a la conclusión que el genoma de 2 personas elegidas de forma azarosa es idéntico en un 99.9%, y el resto se trata de variaciones llamados polimorfismos. Se define polimorfismo como la aparición de 2 o más alelos en un mismo locus genético en una población, apareciendo cada uno con una frecuencia variable, de al menos en un 1% de la población (165,166).

Se define a su vez el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) como el cambio puntual de un nucleótido y es la forma más habitual de modificación genética. Las bases: adenina, citosina, guanina y timina del DNA pueden ser sustituidas por cualquier otra por lo que cualquier SNP tendría 4 formas o alelos; aunque habitualmente sólo aparecen 2 formas (167).

La ratio de variación del DNA es de un SNP cada 100 a 300 bases. La mitad de ellos ocurren en zonas del genoma que no son codificantes y la otra en zonas codificantes; y de estas últimas la mitad son SNPs sinónimos (sSNP), es decir, no modifican la cadena de aminoácidos al transcribirse. Por tanto, los sSNPs son mutaciones silentes que no cambian la cadena de aminoácidos y no se modifican a través de la selección natural. Por otro lado, los SNPs no sinónimos (nSNPs) son mutaciones con cambio de sentido que alteran el aminoácido que codifican y están influenciadas por la selección natural. Tanto sSNP como nSNP podrían modificar la morfología del mRNA y por tanto modificar la expresión y la actividad de las proteínas; por lo que pueden influir en la aparición de enfermedades o la respuesta a los tratamientos (166).

1. SNPs en el cáncer de próstata

La frecuencia del CP es superior en hombres afroamericanos que, en aquellos americanos de origen asiático, por lo que se deduce que existen factores genéticos que condicionan estas frecuencias observadas (168).

Estudios genéticos realizados en gemelos concluyen que existe un 50% más de riesgo de padecer CP en gemelos monocigóticos que en aquellos dicigóticos, si el otro hermano presenta CP, por lo que se concluye que existen factores genéticos implicados más allá de los factores de estilo de vida, en la agregación familiar del CP. Además, se ha visto que en estos casos existen variantes genéticas raras y con alta penetrancia. Pero estas variables suelen ser responsables de una baja proporción de CP, habitualmente están

implicadas varias alteraciones comunes y de baja penetrancia. Cada alelo que provoca predisposición provoca un pequeño aumento del riesgo de CP, que se van sumando en conjunto (168,169).

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado variantes genéticas que se asocian a CP. Se han analizado también SNPs que se relacionan con la agresividad en CP en relación con las variables clínicas al diagnóstico o progresión del tumor; y también en la respuesta a tratamientos (170).

En estos estudios se ha asociado la región 8q24 y sus 5 loci diferentes con la probabilidad de CP. Además, se han descubierto genes alternativos que se relacionan con la inflamación y el metabolismo de la próstata; como por ejemplo la variante rs1512268 que se localiza en una región cercana a al gen NKX3.1 que se localiza exclusivamente en la próstata y tiene funciones en la proliferación y desarrollo epitelial de la próstata (171).

Los SNPs que se asocian a riesgo mejoran la sensibilidad en programas de *screening* de CP a través del PSA evitando toma de biopsias innecesarias. Se ha encontrado que la variante rs2735839 del gen KLK3 (19q13) que codifica el propio PSA, es un *loci* asociado a probabilidad aumentada de CP y puede modificar los niveles de PSA. Además, se identificaron 35 SNPs que se relacionan con el riesgo de CP en hombres suecos sometidos a biopsia prostática; se ha visto que la suma de la aplicación de los SNPs al modelo clínico habitual, podría disminuir la cantidad de biopsias necesarias para diagnosticar la misma cantidad de cáncer, evitando hasta un 22.7 % de las mismas (172,173).

En el ensayo clínico REDUCE se evaluó otro panel con 35 SNPs que se asociaron a riesgo de CP. En este caso los pacientes estudiados presentaban una biopsia prostática negativa y se sometieron a biopsias a los 2 y 4 años. La estimación de la probabilidad de desarrollar CP combinó el modelo clínico con el panel de SNPs. La clasificación del riesgo mejoró un 33% de los pacientes al incluir el panel con 35 SNPs y hubo una mejor asociación al resultado de las biopsias (168).

En cuanto a la agresividad del tumor, se han identificado varios SNPs para evaluar la misma. Bensen y colaboradores utilizaron un panel con 1536 SNPs, estudiaron a una cohorte de más de 2000 hombres de origen europeo y africano e identificaron 4 SNPs asociados al CP agresivo: rs2660753 (pseudogen pirofosfato amidotransferasa 1(PPATP1)), rs13254738 (gen PRNCR1), rs10090154 (cromosoma 8q24) y rs2735839 (gen KLK3) (172).

También se ha evaluado la asociación de SNPs con los riesgos de respuesta a los diferentes tratamientos. Se evaluaron 20 SNPs asociados a riesgo de CP en hombres con CP en fase localizada intervenidos mediante prostatectomía radical. Se asociaron 3 SNPs a la recidiva bioquímica: rs1447295 (gen de la susceptibilidad al cáncer 8 (CASC8)), rs7920517 (cromosoma 10q11) y rs10993994 (gen microseminoproteína Beta (MSMB)). Otro estudio evaluó un panel de 19 SNPs, que se habían relacionado previamente con riesgo de CP, como predictores de pronóstico y supervivencia tras el tratamiento con terapia de deprivación androgénica (TDA). Se relacionaron con la mortalidad por CP 2 SNPs: rs16901979 (gen del transcriptoma asociado a cáncer de próstata (PCAT1)) y rs7931342 (cromosoma 11) (174,175).

2. Selección de SNPs como biomarcadores

Varios genes han sido estudiados alterados en la línea germinal del CP como: ATM, BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, el gen de la molécula de la adhesión de la célula epitelial (EPCAM) y el gen del factor de transcripción homeobox (HOXB13). Estudios recientes apuntan a varios SNPs en el gen IL-6 que aumentan el riesgo de padecer varios tumores como: rs1800795, rs1800796 y rs1800796. Las variantes rs1800195 y rs1800796 también se han visto especialmente asociadas CP (176,177).

2.1 IGF2

Uno de los genes en estudio es el del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF2) que ha sido propuesto como un marcador para el manejo de CP. Este gen es importante para la supervivencia celular y la carcinogénesis; y en combinación con el gen del receptor de la somatostatina 2 (SSTR2), se ha visto que tiene un rol importante en la supervivencia de CP (178).

El gen del IGF2 codifica uno de los miembros de la familia de los factores de crecimiento insulínicos, que están involucrados en el desarrollo, mantenimiento y crecimiento del cáncer. Se sabe que el IGF2 se une al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R), que activa de forma secuencial algunos miembros de la vía de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK. Existen estudios previos que relacionan la expresión de IGF2 en el CP, pero también en otros tumores como el cáncer de colon, con la detección de un aumento de fusiones recurrentes en este gen. Además, la proteína 3 de unión al mRNA de IGF2 (IMP3) ha sido vista sobre-expresada y fuertemente asociada a pacientes con peor pronóstico. La función principal de IMP3 se encuentra en la vía de

señalización PI3L/AKT/mTOR. La importancia de IGF2 en el CP no sólo se ha visto a través de SNPs y mRNA, sino también a través de lncRNA; que el caso de IGF2AS se ha relacionado como un supresor de tumores epigenético en CP en humanos. La relación IGF2AS/IGF2 se ha incluido como un posible marcador para terapia diana en CP y cáncer gástrico. Tanto el IGF2 como su receptor IGF1R constituyen una posible diana terapéutica dada la evidencia de que ambos genes bloquean la progresión tumoral desarrollando una importante función antitumoral (178,179).

Existen varios SNPs del IGF2 que presentan una función en el cáncer u otras enfermedades, como el rs1004446, en el que no centramos en este estudio, estudiado como marcador que disminuye conforme disminuye el riesgo de cáncer de endometrio o aumenta con el riesgo de CP. Otros SNPs, como rs4320932, se ha visto que disminuye el riesgo de cáncer de endometrio en portadoras del alelo G, pero no existe evidencia en CP (180,181).

Varios miRNAs han sido evaluados como reguladores de IGF2. Alguno de ellos son el miR-100 y el miR-125b, como un supresor en carcinoma hepatocelular a través de la inhibición de la expresión de IGF2 y activando la vía AKT/mTOR. El silenciamiento de miR-141 bloquea la expresión de VEGF e IGF2 e interfiere en la proliferación osteoblástica, que ha demostrado ser importante en el osteosarcoma. En el cáncer de páncreas ha sido probada la función de miR-141 en la regulación de la proteína de unión de mRNA a IGF2 (IGF2BP2), que desempeña funciones oncogénicas (182–186).

2.2 CYP27B1

Otro gen relacionado con el CP es el miembro 1 de la subfamilia b de la familia 27 del citocromo 450 (CYP27B1) localizado en el *locus* 12q14.1. Dicho gen codifica la 25 (OH)-1 α -hidroxilasa, una enzima de la familia del citocromo P450 que interviene en el metabolismo de la vitamina D; se encarga de convertir la vitamina D en la forma activa: 1,25-dihidroxi-vitamina D, que presenta propiedades anti invasivas, antiproliferativas, proapoptóticas y de diferenciación en CP. La relación de la vitamina D con el CP ha provocado la realización de multitud de estudios intentando relacionar el gen CYP27B1 con el CP. Se ha visto que este gen se encuentra silenciado en las células tumorales (187,188).

2.3 GSTM5

Otro gen susceptible de estudio como marcador puede ser el GSTM5, que se halla en el *locus* 1p13.3 y codifica la enzima glutatión S-transferasa de la clase *mu*. Dicha enzima se encarga de la detoxificación de compuestos electrofílicos como agentes alquilantes o fármacos. Así una expresión alta de este gen puede disminuir la proliferación celular, la migración o la capacidad de invadir. Se ha estudiado la relación de GSTM5 con distintos tipos tumorales, y se ha visto que presenta actividad supresora tumoral y una disminución de la resistencia a Doxorubicina en cáncer de vejiga. No hay resultados concluyentes que relacionen GSTM5 con el pronóstico de CP, aunque se ha observado infra-expresado de forma significativa, lo que puede tener influencia en la carcinogénesis prostática (189–191).

3. SNPs en genes de la síntesis y metabolismo de esteroides sexuales

Se han estudiados numerosos genes encarado de la producción y el metabolismo de andrógenos dado su papel regulador en el CP. El efecto que realizan los andrógenos en el tejido prostático a través de la interacción con el RA ha desembocado en el estudio de las variaciones genéticas del RA y otros genes relacionados con la síntesis y metabolismo de las hormonas sexuales. Los polimorfismos en dichos genes resultarían en la alteración de los valores de estrógenos, andrógenos y su forma de señalización prostática pudiendo estar directamente relacionados con el riesgo, progresión y/o agresividad del CP.(192–194)

Existen numerosos SNPs en genes relacionados con la síntesis y metabolismo de andrógenos. Algunos de los genes más importantes en este aspecto son LHCGR, CYP17A1, RA, ESR1 y ESR2. Los hombres de procedencia americana, europea y surasiática presentan frecuencias alélicas similares del rs2293275 del gen LHCGR y del rs6152 del RA. Otro SNP particular es rs1256049 del gen ESR2 y rs1062577 del gen ESR1, la aparición del alelo más frecuente está muy por encima en los asiáticos del este al compararlos con el resto de lugares. En las variantes rs743572, rs6162 y rs6163 del gen CYP17A1 se ha visto una transposición del alelo más habitual en los hombres del este asiático. Finalmente, el rs9332969 del gen del RA ha sido únicamente estudiado en hombres de procedencia mexicana y japoneses. Estas diferencias en proporciones alélicas

poblacionales pueden ser la clave para las diferencias presentes en la agresividad del CP entre dichas poblaciones (193).

3.1 LHCGR

El gen LHCGR está localizado en el cromosoma 2, en la región p21 y codifica el receptor de la hormona luteinizante y de la coriogonadotropina. LHCGR se incluye dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (195).

Este gen se encarga de la mediación de 2 hormonas relacionadas: la hormona luteinizante (LH) que se sintetiza a nivel de la glándula pituitaria y la gonadotropina coriónica (hCG) excretada a nivel placentario. LHCGR se produce en la teca, granulosa y células lúteas del ovario en la mujer; pero en los hombres es expresada en la membrana de las células de Leydig y es, además, capaz de expresarse en la membrana de las células del CP (196).

Los SNPs y mutaciones en LHCGR están relacionados con alteraciones del desarrollo sexual y reproductivo como la hipoplasia de las células de Leydig. Uno de los SNPs más estudiados ha sido el rs2293275 que se ha relacionado con la reducción de la probabilidad de CP y a la vez de un incremento del riesgo de muerte por CP (197).

3.2 CYP17A1

El gen CYP17A1 se encuentra localizado en el cromosoma 10, en la región q24.3. Se incluye dentro de la superfamilia del citocromo P450, un conjunto de enzimas monooxigenasas que albergan un grupo hemo encargadas de catalizar reacciones oxidativas. Se expresa en la mayoría de los tejidos, pero especialmente en los testículos y en las glándulas suprarrenales (198).

El CYP17A1 presenta actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa que cataliza la transformación de pregnenolona a 17-OH pregnenolona y de la misma a dehidroepiandrosterona (DHEA). También se encarga del paso de progesterona a 17-OH progesterona y de la misma a androstenediona que son precursores de la testosterona. La 17-OH progesterona no es buena molécula para la capacidad liasa del CYP17A1 y conlleva la baja producción de androstenediona, por lo tanto, la producción de androstenediona viene fundamentalmente de la transformación de DHEA que es catalizada por 3 β -HSD en mayor proporción que CYP17A1 (197,198).

Dentro de las glándulas adrenales, CYP17A1 no se presenta en la localización más exterior, conocida como zona glomerular, lo que se lleva a la producción de

mineralocorticoides a raíz de pregnenolona y progesterona. En la parte intermedia conocida como zona fascicular, CYP17A1 se presenta sólo con capacidad 17 α -hidroxilasa por los que se sintetizan glucocorticoides a raíz de 17-OHpregnenolona y de 17-OH progesterona. En la zona interior de las glándulas adrenales conocida como zona reticular, y en las células de Leydig en los testículos, CYP17A1 presenta ambas actividades y por tanto se genera DHEA (198).

La actividad liasa como hidroxilasa son controladas por la NADPH-citocromo P450 reductasa, pero también la actividad liasa se ve controlada por NADPH- citocromo b5 reductasa y está expresada solo en la zona reticular (199).

Las modificaciones de la actividad de CYP17A1 se han relacionado a diversas patologías del espectro hormonal como son la hiperplasia suprarrenal congénita, el síndrome de ovario poliquístico o el CP (199).

CYP17A1 podría relacionarse con la catalización de reacciones que tienen como sustrato diversos xenobióticos con capacidad cancerígena como son el 7,12-dimetil-1,2-benzotraceno y aflatoxina B1. La activación de estas moléculas podría jugar un papel en la carcinogénesis de algunos tejidos como ovarios, testículos y glándulas suprarrenales donde se localiza CYP17A1 (200).

CYP17A1 resulta importante debido a que cataliza varios pasos de la producción de hormonas sexuales, y la supresión de su acción es utilizada en el tratamiento del CP. Los inhibidores de CYP17A1 como Abiraterona o Ketoconazol acetato han sido utilizados para tratar CP en su fase resistente a castración. La Abiraterona inhibe tanto la actividad 17 α -hidroxilasa como 17,20-liasa lo que lleva a una bajada de los andrógenos y de glucocorticoides y a un aumento del cortisol (200).

Existen más de 100 polimorfismos de CYP17A1; y su mayoría en la zona intrónica del gen. Sólo una pequeña parte de los mismos han sido estudiados a nivel poblacional (197).

Se han evaluado varios SNPs del gen CYP17A1 en relación a la probabilidad de la aparición de CP. El más evaluado ha sido rs743572 ubicado en la región 5' no traducida del gen. Dicho SNP podría originar un lugar de unión al factor de transcripción Sp-1 adicional en la región promotora del gen, aumentando su transcripción. En el estudio realizado por *Sarma et cols* se muestra una asociación de los SNPs rs743572, rs6162 y rs6163 con la probabilidad de desarrollar CP en hombre afroamericanos; aunque en

hombre caucásicos no se ha logrado relacionar rs743572 con el CP. Existe un metaanálisis que incluyó 38 estudios con hombres de todos los orígenes raciales que sugiere que rs743572 podría aumentar el riesgo de CP sólo en varones de origen africano (201–204).

Otro polimorfismo del gen CYP17A1 es el rs1004467 que se ha asociado con un aumento de los valores de testosterona y dihidrotestosterona (205).

Por último, se ha valorado el valor predictivo de los inhibidores de la CYP17A1 en el tratamiento del CP surgiendo SNPs que podrían relacionarse con CPRC. Los rs743572, rs6162, rs6163 y rs1004467 se han relacionado con probabilidad de progresión a CPRC en hombres japoneses en tratamiento hormonal (206).

3.3 Receptor androgénico

El gen RA se encuentra localizado en el cromosoma X, en la región q11-q12. El gen se expresa en tejidos como la próstata, testículos, tejido adiposo, hígado, músculo cardíaco, cerebro y hueso. El receptor androgénico se localiza en el citoplasma junto a proteínas de choque térmico y otras chaperonas que hacen que se encuentre inactivo si no presenta ligando. Al unirse los andrógenos al RA provoca un cambio conformacional que libera las chaperonas. El complejo RA/andrógeno se transloca al núcleo, se dimeriza y se une a la cromatina en una región controladora diana llamada AREs. Además, recluta cofactores que participan en la transcripción génica (207,208).

RA resulta esencial en la carcinogénesis del CP y su progresión a CPRC y es la diana terapéutica más utilizada en CP. Se han fabricado antiandrógenos que impiden la unión de los andrógenos al RA, inhibiendo la transcripción de genes de replicación celular. Entre ellos se encuentra la enzalutamida, un inhibidor competitivo del receptor androgénico y que presenta acción de 3 formas distintas sobre la señalización del RA: impide la unión androgénica, impide la translocación nuclear e inhibe la adhesión al DNA (209).

El gen del RA presenta 2 repeticiones polimórficas: CAG y GGN, localizadas en el exón 1. Dichas repeticiones han sido analizadas y relacionadas con la probabilidad de desarrollo de CP. Los resultados han generado controversia ya que existe una proporción inversa entre los valores de expresión del RA y la longitud de las repeticiones CAG o GGN. Un metaanálisis de 61 estudios para CAG y 16 para GGN se vio que las repeticiones cortas de CAG y GGN dentro del gen del RA se relacionan con un aumento

de la probabilidad de desarrollo de CP, sobre todo en hombres de origen caucásico (210,211).

Otro SNP del gen del RA es el rs6152 analizado en CP. Esta variante conocida como *Stul*; se ha asociado con un aumento en el riesgo de CP metastásico. Por otro lado, el análisis de rs6152 no mostró asociación con la resistencia a tratamiento hormonal (212).

3.4. ESR1 y ESR2

Los receptores de estrógenos se encuentran en el núcleo y se comportan como factores de transcripción. El gen ESR1 se encuentra localizado en el cromosoma 6 en la región q24-q27. El gen ESR2 se localiza en el cromosoma 22, en la región q22-q24(213).

En el momento que el estrógeno se une a uno de los ERs se produce un cambio conformacional que hace que se active y se dimerice, aumentando la fosforilación y promoviendo la transcripción de genes diana. Las diferencias conformacionales entre ER α y ER β hace que se produzcan modificaciones transcripcionales distintas (213).

La proteína Era se expresa en el útero, mama, músculo esquelético, tejido adiposo, hipófisis y hueso. Por otro lado, Er β se encuentra en el ovario, próstata, pulmón, sistema cardiovascular y nervioso central. Antagonistas y agonistas que impiden la activación de los ERs han sido utilizados en tratamiento de CP por su capacidad sobre los estrógenos en el desarrollo, la carcinogénesis y a la expresión de ER α y β en células de la próstata (213,214).

El gen ESR1 tiene los SNPs más analizados: PvuII (rs2234693) y XbaI (rs9340799). Los resultados de PvuII y XbaI en relación al riesgo de CP son inconsistentes. Un metaanálisis que incluye 18 estudios de casos- controles mostró relación significativa entre PvuII y XbaI y la probabilidad de desarrollo de CP en hombres caucásicos, pero no en asiáticos. Por otro lado, PvuII se asocia a CP con Gleason superior a 7. Otro SNP de ESR1 estudiado es rs1062577 que se ha asociado a mayor riesgo de recidiva en hombres caucásicos, así como una disminución a la respuesta a tratamiento hormonal en asiáticos. (215,216)

En el caso de ESR2 se ha estudiado rs2987983 y se ha asociado con la probabilidad de CP en un análisis sueco. De la misma forma, el rs1256049 se ha asociado con la probabilidad de CP en varones caucásicos y africanos, pero no en asiáticos. (194,217)

Aplicación de bioinformática en la búsqueda de marcadores genéticos

La bioinformática es una disciplina que se encuadra dentro de la biología y las ciencias de la informática encargada de adquirir, almacenar y publicar información biológica. Normalmente es útil para secuencias de DNA y aminoácidos. Resulta de especial relevancia en la comparación de genes y proteínas de diversos organismos y puede ser válida para averiguar la función de proteínas y genes (218).

La bioinformática ha sido utilizada en el alineamiento de secuencias genéticas y proteicas, predicción de genes, montaje del genoma, alineamiento de proteínas, predicción de la estructura de proteínas, predicción de la expresión génica, interacción proteína-proteína y modelado de la evolución (219).

1. The Cancer Genome Atlas

El proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) fue presentado como uno de los principales proyectos que podrían acelerar el conocimiento de la genética del cáncer a través del uso de tecnologías avanzadas, ayudando a generar nuevas terapias contra el cáncer, métodos diagnósticos y estrategias de prevención. Se trata de un programa molecular formado por más de 20000 muestras de cáncer primario emparejadas con muestras de tejido normal de un total de 33 tipos de tumores (220).

La estructura de TCGA, que comenzó en 2006, se encuentra bien organizada e involucra a varios centros que cooperan en la adquisición y procesado de muestras. Después realizan secuenciación de nueva generación y análisis de los datos mediante sofisticados métodos bioinformáticos. Actualmente ha generado 2.5 petabytes de información sobre genómica, epigenética, transcriptómica y proteómica (220,221).

Esto hace que los datos de TCGA tengan un valor extraordinario en la búsqueda de marcadores genéticos y además es de acceso público para cualquier miembro de la comunidad investigadora.

Hipótesis

Como se ha visto previamente existe evidencia de que los marcadores genéticos se asocian al riesgo de CP y que presentan capacidad diagnóstica pronóstica y predictiva de respuesta a tratamiento. Por otro lado, existen escasos estudios que relacionen dichos marcadores con la agresividad de la enfermedad.

En los últimos años se ha avanzado mucho en la detección y diagnóstico precoz del CP a través de la generalización del programa de screening con PSA, la aplicación de la RMN al diagnóstico y la aparición de la biopsia fusión ecografía y RMN. Tal ha sido el avance que en el momento actual se plantea la posibilidad de que se esté sobre diagnosticando y sobre tratando el CP.

Bajo esta premisa la diferenciación entre aquellos tumores agresivos frente aquellos silentes cobra una especial atención. Sin duda una de las herramientas que puede ayudar en este momento es la búsqueda de biomarcadores que se relacionen la agresividad tumoral. Dichos marcadores facilitarían la clasificación de la agresividad permitiendo seleccionar pacientes que se beneficiarían de tratamientos menos invasivos y seleccionando aquellos que necesitaran un tratamiento más radical.

En este trabajo se analiza la expresión de 8 miRNAs y la interacción de diferentes polimorfismos de 3 genes previamente relacionados con la carcinogénesis, detección o pronóstico en el CP para evaluar su relación con la escala de Gleason, la variable clínica que más fuertemente se asocia a agresividad en este momento.

Objetivos

Objetivo principal

El objetivo principal del estudio es conocer las variables genéticas que pueden asociarse a agresividad y respuesta a tratamiento hormonal en pacientes con CP mediante el análisis de variantes genéticas candidatas.

Objetivos secundarios

1. Identificar biomarcadores genéticos que permitan ayudar a clasificar a los pacientes según la agresividad de su tumor y respuesta a tratamiento hormonal. Esto facilitará el tratamiento individual adecuado y supondrá un acercamiento a la medicina de precisión en el CP.
2. Realizar una búsqueda del papel de los miRNAs que se asocian a pronóstico o diagnóstico según los estudios moleculares y validaciones *in vitro*.
3. Establecer factores predictores de agresividad en función del análisis miRNAs integrando en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata y clasificados según la escala Gleason.
4. Seleccionar SNPs de los genes IGF2, CYP27B1 y GSTM5 que puedan estar relacionadas con la respuesta hormonal al tratamiento y agresividad del CP.

Material y métodos

Población de estudio

Se incluyen 336 hombres, 136 muestras en forma de hisopos bucales, 200 de sangre periférica almacenada en tubos con anticoagulante EDTA; que presentan CP seleccionados por el servicio de Urología de los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves, Torrecárdenas y complejo hospitalario de Jaén. Se incluyen muestras de hombres sanos y pacientes que presentaban niveles de PSA por encima de 4 ng/ml y presentan criterios clínicos para realizar una biopsia prostática por lo que se confirma el diagnóstico de adenocarcinoma prostático histológicamente. Dichos pacientes se reclutan entre 2012 y 2021, dichas muestras se usan en esta tesis sólo en pacientes que cumplen los criterios de inclusión y con la finalidad de validar los biomarcadores obtenidos en biopsia líquida. El estudio se realiza respetando las consideraciones éticas establecidas en el protocolo de Helsinki; el plan de investigación ha sido aprobado por las juntas locales de revisión y los comités éticos: PEIBA, 1638-M1-19 y 1503-M2-20; y Comité Ético de Investigación de Granada (CEI-Granada con el código interno 0340-N-20). Según la normativa vigente se realizó un consentimiento informado adecuado al estudio que fue rellenado y aceptado por todos los participantes.

Los criterios de inclusión del grupo de pacientes tratados con bloqueo hormonal son:

- Pacientes con CPRC definido como progresión a tratamiento hormonal con testosterona por debajo de 50ng/dL. La progresión se definió según 2 posibles criterios:
 - Progresión radiológica: aparición de nuevas lesiones que serían 2 óseas o 1 en tejido blando según criterios Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST).
 - Progresión bioquímica: 3 elevaciones consecutivas de PSA con al menos 1 semana de separación entre las determinaciones; y al menos 2 elevaciones de ellas de más del 50% del PSA nadir alcanzado con terapia hormonal y un PSA total superior a 2 ng/mL.

- Cualquier paciente con CP sensible a castración en tratamiento con análogos LHRH durante al menos 3 años de tratamiento. Sin importancia de la existencia de metástasis.

Se excluyen aquellos pacientes en tratamiento con TDA con menos de 3 años que no presentan criterios de resistencia a castración.

Además, se recogen todas las variables clínicas pronósticas: edad, PSA al diagnóstico, clasificación de los hallazgos de la biopsia según *International Society of Urological Pathology* (ISUP) y de la pieza de prostatectomía si procede, clasificación en grupo de riesgo de la Asociación Europea de Urología, PSA nadir con TDA, la presencia de metástasis y su localización.

Después de la recogida de muestras y para obtener los resultados los pacientes tratados con TDA se clasificaron en 2 grupos

- Sensibles: pacientes en tratamiento con TDA que tardaron >3 años en volverse resistentes a castración.
- Resistentes: pacientes en tratamiento con TDA que tardaron ≤ 3 años en volverse resistentes a castración.

Materiales

1. Sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se extrajeron a través de punción venosa y fueron almacenadas en tubos DB Vacutainer que contienen EDTA como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron a la llegada al laboratorio y se alicuotaron en tubos de 2ml para su posterior almacenamiento a -20°C hasta su utilización.

2. Células epiteliales bucales

Se recolectaron 2 hisopos de la mucosa bucal a través del frotis sobre la zona de desembocadura del conducto de Steno durante 30 segundos. Dichos hisopos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

3. Tejido fresco

La forma de extracción de tejido prostática fue a través de la biopsia transrectal guiada por ecografía. El paciente se administraba el día de antes una profilaxis antibiótica con quinolonas y un enema de limpieza rectal. En el momento de la biopsia se realizó la inoculación de 10cc Mepivacaina al 2% en el espacio entre las vesículas seminales y la próstata. Se utilizó un ecógrafo con sonda transrectal y una guía de punción por la que se introdujo un *trucut* para extracción de cilindro ancho de tejido. La sistemática fue biopsia randomizada con toma de muestra de diferentes partes de la próstata que se divide en 2 lóbulos: izquierdo y derecho. A su vez cada lóbulo se divide en ápex, centro y base. De cada ápex y base se extrajeron 2 cilindros, mientras que de cada centro se obtuvieron 3 cilindros; con el objetivo de diagnosticar CP. Además, se obtuvieron 2 cilindros extra de cada paciente para su análisis en este estudio, que se almacenaron a -80° hasta su posterior análisis. Se muestra un esquema de la extracción en la figura 8.

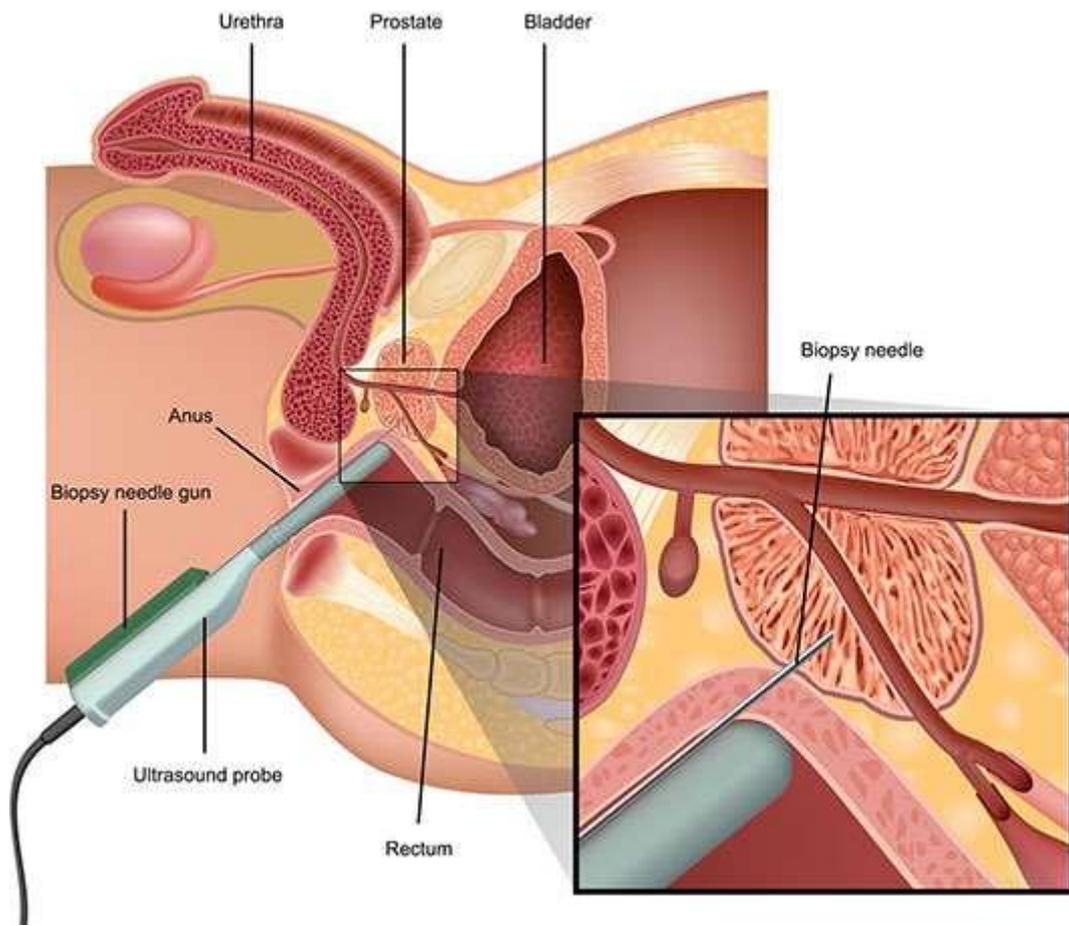


Figura 8: Esquema de biopsia prostática.

Metodología

En esta tesis se plantea un estudio analítico que combina resultados de cohorte de repositorios públicos bioinformáticos que posteriormente se validan en el laboratorio según el procedimiento que se describe a continuación.

1. Análisis Bioinformático

Se inicia el estudio con el análisis bioinformático con el objetivo de seleccionar los mejores genes, SNPs y miRNAs candidatos ser biomarcadores y confirmarse posteriormente su utilidad con el análisis experimental.

1.1 TCGA de adenocarcinoma prostático

Se utiliza la base de datos correspondiente a adenocarcinoma prostático (PRAD) del programa *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* para realizar un análisis de expresión diferencial de genes o miRNAs. Se extraen todos los valores de expresión disponibles de la base de datos PRAD que contiene 550 casos, tanto tumorales como no tumorales de muestra de tejido. De los 480 casos tumorales, 285 presentan puntuación Gleason ≤ 7 que corresponde con un ISUP ≤ 3 y 195 corresponden a pacientes con puntuación Gleason > 7 que corresponde a ISUP > 3 . Se utiliza terminología Gleason según la publicación del artículo.

1.2 Grupos de estudio TCGA

Para realizar análisis de expresión diferencial (ED), con el objetivo de determinar genes o miRNAs que se expresen de forma diferente; se establecen grupos de comparación en relación a la agresividad tumoral y a la efectividad del tratamiento.

ED relacionada con la agresividad según la escala D'Amico así como la escala de Gleason en la que se definen 3 categorías:

- G0= muestras no tumorales.
- G1= escala de Gleason ≤ 7 .
- G2 escala de Gleason > 7 .

Para el análisis de ED relacionada con la respuesta a TDA en la que se utilizan 4 dianas terapéuticas aparte de la quimioterapia con Docetaxel: agonistas LHRH, antagonistas LHRH, antiandrógenos e inhibidores CYP17. Se establecen 3 categorías:

- DR1: tratamiento basado en el uso de una única diana terapéutica.
- DR2: tratamiento en el que un nuevo fármaco se ha utilizado por falta de eficacia de otro.
- DR3: utilización de quimioterapia.

Se realizaron filtros de baja expresión para cada análisis utilizando un umbral representativo según el número de muestras.

1.3 Análisis de expresión diferencial

El análisis de la expresión diferencial en TCGA se realiza utilizando edgeR (versión 3.28.0) Bioconductor package (222). El Modelo Lineal Generalizado (GLM) se utilizó para incluir un diseño experimental con la escala de Gleason como factor. Se realizó un test F de cuasi semejanza (QL) para determinar la expresión diferencial de los diferentes genes, SNPs o miRNAs en relación a la agresividad del tumor según la escala de Gleason y riesgo D'Amico. Se eliminan aquellos genes, SNPs o miRNA con muy baja expresión, es decir, aquellos que no llegan a un contaje por cada millón en un mínimo de 51 muestras. Las muestras se normalizan utilizando el método de significado recortado de los valores M (TMM). El valor p se ajusta según el procedimiento de falsos descubrimientos de Benjamini-Hochberg (FDR). Los genes, SNPs o miRNAs que presentan diferencias en la expresión son aquellos que tienen un cambio doble (FC) igual o superior a 1.5 y un FDR menor a 0.05. El algoritmo de análisis de los componentes principales (APC) (223) se utiliza para la representación gráfica de la distribución de las muestras en función de la expresión diferencial de los genes o miRNAs utilizando las versiones M3C (versión 1.8.0), ggrepel (versión 0.8.1) y ggplot2 (versión 3.0.1) en el ámbito R.

1.4. Análisis *in silico*

Se realiza también un análisis de las diferentes variantes estudiadas con el software “*The variant effect predictor*” (224). Se utiliza este software para calcular cambios en transcriptomas y la posible malignidad de las variantes. También se utiliza la herramienta ClinVar para la validación de los datos. Este análisis se desarrolla para confirmar las interacciones con los genes de otra vía germinal o para evaluar las mutaciones somáticas, así como las interacciones de los miRNAs.

2. Análisis molecular

2.1 Extracción DNA

En las muestras de sangre se realiza una extracción orgánica con fenol/cloroforno/alcohol isoamílico (25:24:1) previa digestión con buffer de lisis, proteinasa K y 1,4 Dithiothreitol (DTT). El protocolo empleado es el de *Real Blood DNA Kit* que se muestra en la figura 9.

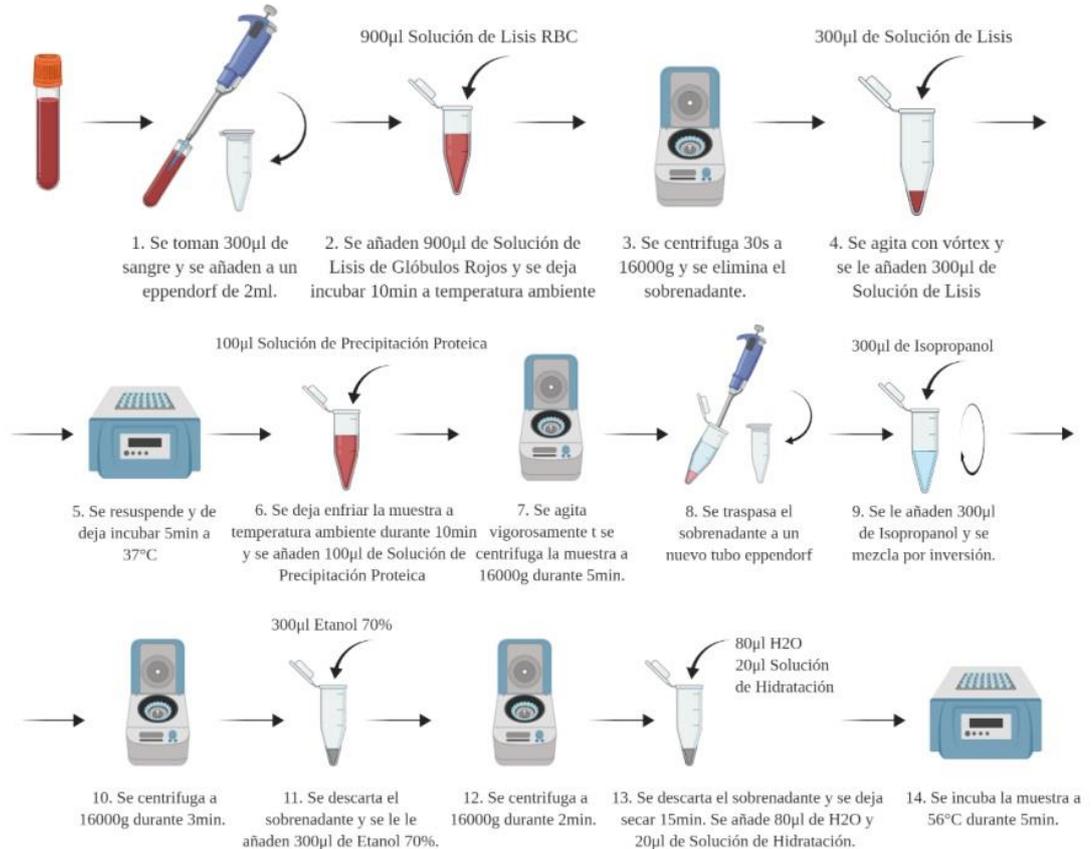


Figura 9: Extracción de DNA de muestra de sangre.

En el caso de las muestras de hisopo se incuban con 1 ml de Stain Extracción Buffer junto a proteinasa K durante 2 horas en un termobloque a 65° y a 600 rpm para asegurar la lisis celular. Después se procedió a la extracción de DNA según el método de Freeman et al, con las modificaciones de Gomez-Martín A. et al. Se muestra en la figura 10 y se detalla en el Anexo 1.



Figura 10: Extracción de DNA de hisopos bucales.

2.2 Genotipado a través de sondas TaqMan®

En este caso se utilizaron 2 SNPs: rs1004446 y rs3741211; que se analizaron utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Esta metodología se basa en una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) y una determinación de punto final de signos fluorescentes resultantes con el sistema de 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los análisis de genotipado o diferenciación alélica de Applied Biosystem utilizados contenían 2 sondas TaqMan, una señalada con fluorocromo VIC unido al extremo 5' del alelo 1 y otra sonda señalada con fluorocromo FAM unido al extremo 5' del alelo 2. Solo emitirá fluorescencia aquella sonda que presenta la serie alélica que se complemente con la serie de DNA de la muestra de estudio y de esta forma se mostrará qué alelos están presentes en dicha muestra como se muestra en la figura 11.

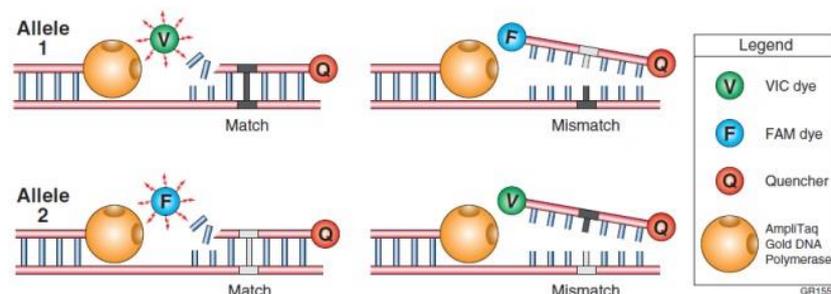


Figura 11: Compatibilidad e incompatibilidad entre alelos y secuencias de sondas en ensayos de discriminación alélica. (Applied Biosystem)

Cuando se produjo emisión de fluorocromo VIC se señala homocigosis para el alelo 1; mientras que la producción de fluorocromo FAM señala homocigosis para el alelo 2; y si se produce fluorescencia de los 2 tipos, indicaba heterocigosis en dicha localización de la secuencia.

La reacción necesita los siguientes reactivos por pocillo: DNA genómico purificado previamente, TaqMan Genotyping Master Mix, TaqMan SNP Genotyping Assay (específico de cada SNP) y H₂O libre de DNAsas.

En cada estudio se utiliza un control negativo (NTC) que alberga cada componente de la ecuación salvo DNA y 3 controles con DNA con genotipo conocido: un homocigoto de cada alelo y un heterocigoto.

Tras realizar la amplificación se realiza una lectura de las marcas de fluorescencia recogida durante la amplificación y se analizan los resultados a través de *Allelic Discrimination (AD) Plate Document* que permite la determinación de la combinación de alelos que se encuentran en cada muestra en función a la marca de fluorescencia que emite el pocillo. Se utiliza *Stardar curve (AQ) Plate Document* para muestras dudosas o sin determinar.

2.3 Validación de genotipado a través de la secuenciación

Una vez se realiza el estudio de SNPs, es preciso validar los resultados para excluir falsos positivos. Para ello se realiza una secuenciación por Sanger de un 3% de las muestras seleccionadas al azar para cada SNP.

La secuenciación Sanger permite conocer la posición de los nucleótidos en la cadena de DNA y por tanto permite conocer qué alelo ocupa la posición en cada SNP.

Antes de empezar la secuenciación es preciso amplificar la región donde se encuentre el polimorfismo y purificar los productos amplificados.

Para amplificar la región de DNA del polimorfismo se desarrollan un conjunto de primers para cada SNP a través del programa Primer 3 (v.0.4.0) y se utiliza la *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA). La amplificación se lleva a cabo en un termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystem, Foster City, CA). La calidad de la amplificación del DNA se determina a través de electroforesis en gel de agarosa 2%.

Después se procede a purificar las muestras de DNA amplificadas para eliminar los restos de primers, nucleótidos y enzimas que puedan alterar el procedimiento de secuenciación; utilizando *MicroElute Cycle-Pure Kit Centrifugation* (Omega Bio-tek, Norcross, GA). La concentración y la pureza de las muestras amplificadas se determinan en el *NanoDrop 2000c*.

Tras esto se procede a la secuenciación por Sanger utilizando la combinación de los kits *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reacción de secuenciación se realiza en *Veriti Thermal Cycler*.

Finalmente, el resultado de la secuenciación se separa por electroforesis en función de su dimensión con el equipo *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, CA). En el transcurso de la migración de los resultados por el capilar del aparato un láser incide sobre los mismos y causa la activación de los fluorocromos unidos a las bases y produce la transmisión de fluorescencia de una longitud de onda diferente para cada nucleótido que es recibida por un detector. El sistema *Software SeqScape* transforma la señal fluorescente en datos para el estudio con *Sequence Scanner Software v2.0* (Applied Biosystem, Foster City, CA).

2.4 Extracción miRNAs

Se comienza con la extracción de RNA del tejido prostático extraído en la biopsia. Se utilizó Trizol/cloroformo. El RNA extraído se cuantificó con NanoDrop 2000c con el objetivo de conocer su concentración y pureza. Se aceptó como RNA puro una relación A260/A280.

Para el análisis de expresión se realiza la técnica de retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) que se trata de la técnica más sensible para identificar y cuantificar la cantidad de miRNAs que contiene una muestra.

Se comienza transcribiendo el RNA a DNA complementario (DNAc) a través de la enzima retrotranscriptasa. La cadena de DNAc se utiliza como molde para la reacción de qPCR. El estudio de la expresión de miRNAs se realiza a través de sondas TaqMan (Applied Biosystem, Foster City, CA).

2.5 Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción de los miRNAs se utilizan 2 kits distintos:

- Kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* para RNA pequeño nucleolar RNU6B que está pensado para trabajar a través de primers particulares para cada miRNA que se proporcionan juntos a las sondas TaqMan.
- Kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* para los miRNAs miR-141, miR-375 y miR-130b (ambos de Applied Biosystem, Foster City, CA). Este hecho permite partir de una sola muestra de RNA se obtenga una molécula de DNAc con varias dianas de miRNA.

Las retrotranscripción se realiza en el termociclador Veriti Thermal Cycler empleando reactivos y condiciones recomendados para el caso. El DNAc de las muestras fue almacenado a -20° hasta su uso posterior.

2.6 Amplificación por qPCR

Se utilizan los siguientes reactivos para llevar a cabo la reacción: DNAc diluido previamente, *TaqMan Universal PCR Master Mix* (contiene *AmpliTaq Gold DNA Polimerasa*, *dNTPs* con *dUTP*, *ROX Passive Reference*, *AmpErase UNG* y buffers); *TaqMan miRNA Assay* o *TaqMan Advanced miRNA Assay* (específico para cada miRNA) que contienen 2 primers para la secuencia de la región de interés.

En los análisis se realizan 3 réplicas para evitar dispersiones y mejorar su precisión. Se incluye un control negativo (NTC).

La reacción de amplificación se realiza en el sistema *7900 HT Fast Real.Time PCR* que realiza curvas de amplificación en tiempo real en el *Standard Curve (AQ) Plate Document*.

Los niveles Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de miRNA/RNAm diana y estiman el nivel de expresión.

2.7 Control endógeno

El miRNA miR-130b, el RNA pequeño nucleolar RNU6B y el gen GAPDH se eligen como genes de referencia potenciales; y se evalúan para determinar cuál de ellos es más estable a la hora de normalizar la expresión. Para ello se usan 2 herramientas:

- *NormFinder*: utiliza valores de expresión de escala lineal y determina el valor de estabilidad de error estándar para cada control endógeno.
- *BestKeeper*: utiliza valores Ct para localizar el control endógeno de mayor estabilidad comparando por pares entre genes. Calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación.

2.8 Análisis estadístico de los resultados

Se emplean el paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Inc, Armonk, NY) y el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) para el estudio estadístico y la explicación de los resultados.

En primer lugar, se realiza un análisis descriptivo de las variables clínicas en la población analizando la media, desviación típica, frecuencia y/o porcentajes. Las variables continuas se categorizaron. Para probar la normalización de las muestras se desarrolla un test de Shapiro-Wilks para el análisis de SNPs.

Se utilizan los tests Chi-cuadrado y Fisher para evaluar la homogeneidad en la distribución de los genotipos entre grupos. La asociación entre variables clínicas y SNPs se analizan mediante regresión logística binaria ajustada a las variables necesarias en cada caso. Los valores estimados de asociación se calculan mediante OR e intervalo de confianza al 95%.

Se analiza la relación entre SNPs y el tiempo de supervivencia libre de recurrencia bioquímica tras tratamiento utilizando el análisis de Kaplan-Meier y el test log-rank para la confirmación. El análisis de regresión de Cox se utiliza para asociar previamente los SNPs y la supervivencia libre de recidiva bioquímica ajustando el valor de PSA cuando se realiza el diagnóstico, la escala Gleason, el estadio T y la edad. El valor de significación establecido en todos los análisis fue un valor igual o menor a 0.05.

Además, se realiza un análisis de Hardy-Weinberg utilizando el software SNPstats. Por otro lado, se utilizan el análisis de desequilibrio de ligamento y de asociación de haplotipos con los programas SNPstats y Haploview v.4.2 (225,226).

- Equilibrio de Hardy-Weinberg: se trata de un fundamento de poblaciones que decreta que en ausencia de factores modificadores la frecuencia genotípica y alélica en una población se mantiene estable de una generación a otra. Presenta una ecuación que se utiliza para comprobar si la frecuencia genotípica observada en la población de un estudio coincide con la predicción realizada por la ecuación incluyendo un test de Chi-Cuadrado. Un valor significativo con p igual o inferior a 0.05 implica diferencia entre la frecuencia encontrada y la frecuencia esperada en la población, y por ende la población no presenta equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Desequilibrio de ligamiento: se trata de la relación no azarosa de alelos localizados en loci cercanos. Dichos alelos que se localizan de forma adyacente presentan una mayor probabilidad de segregarse juntos debido a que en el proceso de la meiosis existe escasa recombinación entre ambos. Por tanto, ambos alelos forman un bloque o haplotipo. Existe una ecuación por la cual se considera que 2 SNPs se encuentran en desequilibrio de ligamiento cuando presenta un valor r^2 mayor a 0.8. Los haplotipos generados se estudiaron en asociación a la aparición de cáncer y a parámetros clínicos de los hombres con CP a través de la regresión logística con el software SNPstats.

En el caso de los miRNAs el análisis estadístico es diferente, se utiliza el paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Inc, Armonk, NY) y el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) se usan para estudio estadístico y emisión de los resultados. Se establece un p valor menor o igual a 0.05 como estadísticamente significativo.

Los niveles de expresión de cada miRNA se presentan en primer lugar como valores Ct comparativos a la expresión RNU6B como control endógeno, utilizando la media $2^{-\Delta\Delta c}$. Los niveles Ct no definidos en Ct=35 se valoran como indeterminados. Para realizar el estudio de datos fue preciso normalizar los niveles Ct de cada muestra, sustrayendo la cifra de Ct de un control endógeno para los miRNA del análisis.

Se utiliza el test de Kolmogrov-Smirnov para estudiar la distribución normal de los valores. Finalmente, para encontrar las diferencias significativas entre valores de expresión de miRNAs y los parámetros clínicos se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney.

En el caso del periodo libre de recidiva bioquímica en hombres tras comenzar el tratamiento se realizó con el análisis de Kaplan-Meier. Para determinar la significancia pronóstica de los miRNAs se comparan hombres con una expresión por encima de la media frente a aquellos con expresión menor a la media fijada para cada tratamiento.

KDR y IGF2. En el caso de IGF2 se muestra sobre-expresado en pacientes que presentan escala Gleason ≤ 7 . Los resultados se muestran en la tabla 8. Los datos que se obtienen de la ED en base a la clasificación en respuesta al tratamiento tipo TDA muestran que ningún gen presenta resultados significativos salvo el gen IGF2 que se encuentra infra-expresado en pacientes con resistencia al tratamiento, más detalles en la tabla 9.

Tabla 8. ED de IGF2 y los genes de proteínas que interactúan con IGF2 en función de la escala Gleason.

Gen	LogFC	FDR	p valor	Test
<i>NRP2</i>	-1.3309	1.08E-18	4.55E-20	G0 vs G1
<i>IGFBP2</i>	0.9156	2.74E-09	5.53E-10	G0 vs G1
<i>KDR</i>	-0.8654	2.98E-09	6.02E-10	G0 vs G1
<i>IGFBP3</i>	-0.6879	1.08E-06	3.27E-07	G0 vs G1
<i>IGFBP4</i>	-0.5516	4.89E-05	1.95E-05	G0 vs G1
<i>IGF2R</i>	0.4125	0.0002	9.81E-05	G0 vs G1
<i>IGF2</i>	-0.9725	0.0008	0.0004	G0 vs G1
<i>HIF1A</i>	-0.3241	0.0015	0.0008	G0 vs G1
<i>IGFBP5</i>	-0.4570	0.0022	0.0012	G0 vs G1
<i>IRS1</i>	-0.4073	0.0042	0.0023	G0 vs G1
<i>VEGFA</i>	-0.5247	0.0145	0.0089	G0 vs G1
<i>IGF1R</i>	0.2770	0.0411	0.0278	G0 vs G1
<i>NRP2</i>	-1.0033	2.46E-10	4.61E-11	G0 vs G2
<i>KDR</i>	-0.7398	1.28E-06	4.17E-07	G0 vs G2
<i>IGFBP4</i>	-0.6542	2.88E-06	9.91E-07	G0 vs G2
<i>IGFBP2</i>	0.6512	2.29E-05	9.07E-06	G0 vs G2
<i>NRP1</i>	0.5826	0.0003	0.0001	G0 vs G2
<i>IGFBP6</i>	-0.7334	0.0007	0.0004	G0 vs G2
<i>IRS1</i>	-0.4930	0.0007	0.0004	G0 vs G2
<i>IGF2</i>	0.9849	0.0045	0.0026	G0 vs G2
<i>HIF1A</i>	-0.2941	0.0057	0.0033	G0 vs G2
<i>VEGFA</i>	-0.4553	0.0431	0.0296	G0 vs G2
<i>IGF2</i>	1.9574	2.63E-23	1.13E-25	G1 vs G2
<i>IGFBP3</i>	0.6200	2.61E-11	6.90E-13	G1 vs G2
<i>NRP1</i>	0.6150	4.31E-11	1.18E-12	G1 vs G2
<i>IGFBP5</i>	0.3610	0.0002	4.10E-05	G1 vs G2
<i>IGF2R</i>	-0.2329	0.0008	0.0002	G1 vs G2
<i>IGFBP6</i>	-0.4501	0.0017	0.0004	G1 vs G2
<i>NRP2</i>	0.3275	0.0017	0.0005	G1 vs G2
<i>IGFBP2</i>	-0.2644	0.0043	0.0013	G1 vs G2

Tabla 9: ED del gen IGF2 y las proteínas que interactúan con IGF2 utilizando la respuesta a TDA como factor.

Gen	LogFC	FDR	p valor	Test
IGF2	-3,7897	0.0356	3.34E-05	DR1 vs. DR2
HIF1A	-0.3258	0.9993	0.0750	DR1 vs. DR2
INSR	-0.1866	0.9993	0.1172	DR1 vs. DR2
IGF1	-0.7810	0.9993	0.1578	DR1 vs. DR2
NRP1	-0.3453	0.9993	0.2148	DR1 vs. DR2
KDR	-1.5433	0.4511	0.0021	DR1 vs. DR3
IGF2	-5.9003	0.4989	0.0061	DR1 vs. DR3
NRP2	-1.7592	0.5063	0.0107	DR1 vs. DR3
FLT1	-1.2236	0.5312	0.0344	DR1 vs. DR3
IGFBP4	-1.1746	0.5312	0.0370	DR1 vs. DR3
KDR	-1.7319	0.3569	0.0009	DR2 vs. DR3
HIF1A	0.9049	0.4231	0.0068	DR2 vs. DR3
NRP2	-1.4243	0.5395	0.0359	DR2 vs. DR3
GPC3	-1.2143	0.5527	0.0464	DR2 vs. DR3
IRS1	-1.0765	0.5732	0.0664	DR2 vs. DR3

1.2 Análisis funcional

Se realiza un análisis funcional de los genes asociados con agresividad y diagnóstico en relación a IGF2. Este análisis se realiza utilizando IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) y DAVID *Bioinformatics Resources* v6.8. Se utiliza para obtener el rol de conjunto de genes, las implicaciones clínicas, ontología y su implicación en las vías metabólicas. Como resultado se obtiene que los proteoglicanos se ven aumentados como confirman los valores p (4.6 e-08) y FDR (1.6e-06). Las vías de estimulación de IGF2, IGF1 y la propia insulina activan sus receptores específicos que son IGF1R, IGF2R/IR y los receptores híbridos. La unión de los ligandos a sus receptores conduce a la autofosforilación de los restos de tirosina de cada receptor, que lleva al reclutamiento de

el sustrato receptor de insulina (IRS) y las proteínas de adaptación SHC al dominio intracelular junto a las subunidades β de los receptores. Este proceso que se resume en la figura 13, conduce a la activación de varias cascadas de señalización a través de PI3K-AKT y RAS/RAF/MEK/ERK/ERK, que resulta en la estimulación de la traducción y por tanto en la promoción del ciclo celular, aumento de crecimiento y proliferación, e inhibición de la apoptosis.

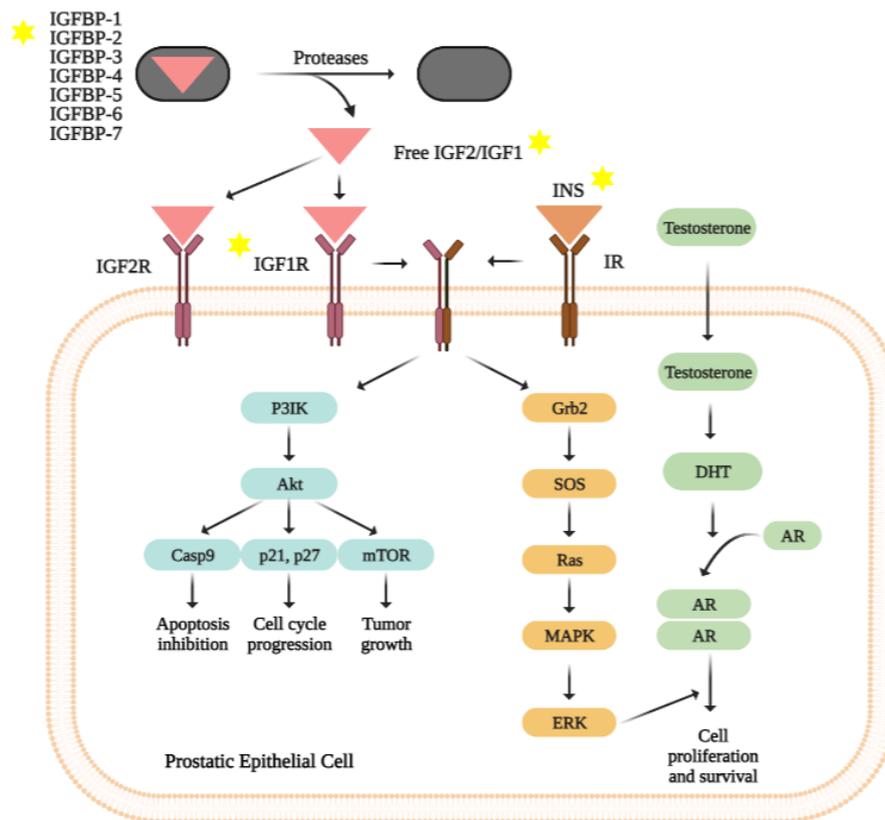


Figura 13: vías de señalización IGF2, IGF1 e insulina

1.3 Mutaciones somáticas TCGA

De acuerdo al análisis *in silico* y las comparaciones en TCGA se obtienen datos importantes de SNPs en IGF2 con efecto patogénico. Es el caso de las variantes rs1114167321, rs553443857, rs1057518115, rs1064794050 y rs869320620. Al analizar las mutaciones somáticas, rs758164144 es la variante más frecuente en la cohorte G1, mientras que rs38442753 sólo se presenta en la cohorte G2, aunque con escasa presencia.

El rs1004446 también presenta una mutación somática en el grupo G1, aunque no se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Resumen de las principales mutaciones somáticas en IGF2 según la cohorte de CP de TCGA.

Posición de la mutación	Identificación de la mutación	Total	Puntuación Gleason ≤7	G2 Puntuación Gleason >7
2133567	rs758164144	7	6	1
2136949	rs3213216	4	2	2
2159830	rs3842753	2	0	2
2160994	rs689	2	2	0

2. Análisis molecular

Una vez realizados los análisis bioinformáticos se realiza la verificación molecular utilizando, en este caso, sólo muestras de sangre. En este caso se realizan en 90 muestras. Las características clínicas de los pacientes que se procesan para estos análisis se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: descripción clínica de los pacientes.

Variables	Número (Porcentaje)
Edad en años	
<60	5 (7.69%)
60-69	19 (29.23%)
70-79	30 (46.16%)
≥80	11 (16.92%)
PSA (ng/ml)	
<20	37 (47.44%)
≥20	41 (52.56%)
Escala de Gleason	
≤7	44 (53.01%)
>7	39 (46.99%)
Clasificación D'Amico	
Riesgo bajo	8 (10.53%)
Riesgo intermedio	20 (26.31%)
Riesgo alto	48 (63.16%)
Respuesta a tratamiento hormonal	
Sensibles	35 (38.04%)
Resistentes	57 (61.96%)
Metástasis	
Sí	45 (48.91%)
No	47 (51.09%)

2.1 Selección de los SNPs de IGF2

En base a bases de datos públicas como *The National Center for Biotechnology Information*, seleccionamos 2 SNPs para el presente estudio: rs1004446 y rs3741211. Sólo se seleccionan aquellos SNPs con una frecuencia alélica superior al 20% en el alelo menor en la población caucásica de acuerdo a la base de datos Ensembl.

2.2 Análisis de desequilibrio de ligandos

Para el gen IGF2 los SNPs rs1004446 y rs3741211 se encuentran linkados con una $r=0.9798$ por lo que sólo se ha analizado rs1004446 usando la metodología de genotipado por TaqMan.

2.3 Asociaciones del genotipo rs1004446 de IGF2

En relación a la agresividad se utilizan las variables clínicas de escala de Gleason comparando 2 grupos, uno de ellos >7 y otro ≤ 7 . También se evalúa el valor del riesgo D'Amico. En ninguno de los casos se obtienen valores estadísticamente significativos. De la misma forma ocurre con la sensibilidad o resistencia a tratamiento, que no presenta ningún valor estadísticamente significativo como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12: Asociación del genotipo rs1004446 con la agresividad y respuesta a TDA.

Variables	G/G	A/A-A/G	Valor P	OR	95% IC
Respuesta a tratamiento					
Sensibles (n=18)	9 (31.03%)	9 (25%)	0.589	1.350	0.454-4.015
Resistentes (n=47)	20 (68.97%)	27 (75%)			
Puntuación Gleason ≤ 7 (n=28)	12 (46.15%)	16 (51.61%)	0.682	0.804	0.283-2.283
Puntuación Gleason >7 (n=28)	14 (53.85%)	15 (48.39%)			
Riesgo Bajo/Medio D'Amico (n=16)	6 (27.27%)	10 (37.04%)	0.468	0.638	0.188-2.161
Riesgo alto D'Amico (n=33)	16 (72.73%)	17 (62.96%)			

2.4 Análisis de expresión génica a través de qPCR

Los resultados que se obtienen con la qPCR de tejido prostático se analizan con el método Ct y el test t-student de datos no pareados, se mantiene la significancia estadística en un valor $p<0.05$. El valor de la expresión genética de cada paciente se calcula como la media \pm desviación típica de 3 replicaciones diferentes. Se realiza un análisis del rango mediante el test de Tukey para detectar valores anómalos. Aunque no se pudo alcanzar la significancia estadística se ven los patrones similares al análisis realizado a través del estudio bioinformático. Para IGF2 la media de expresión $2^{-\Delta\Delta c} \pm$ desviación típica para el G1 es 1.185 ± 1.247 , para G2 es 1.642 ± 1.542 , para el grupo sensible a TDA es 1.871 ± 2.15 y para el grupo resistente es 0.8775 ± 0.534 ; la representación aparece en la figura 14.

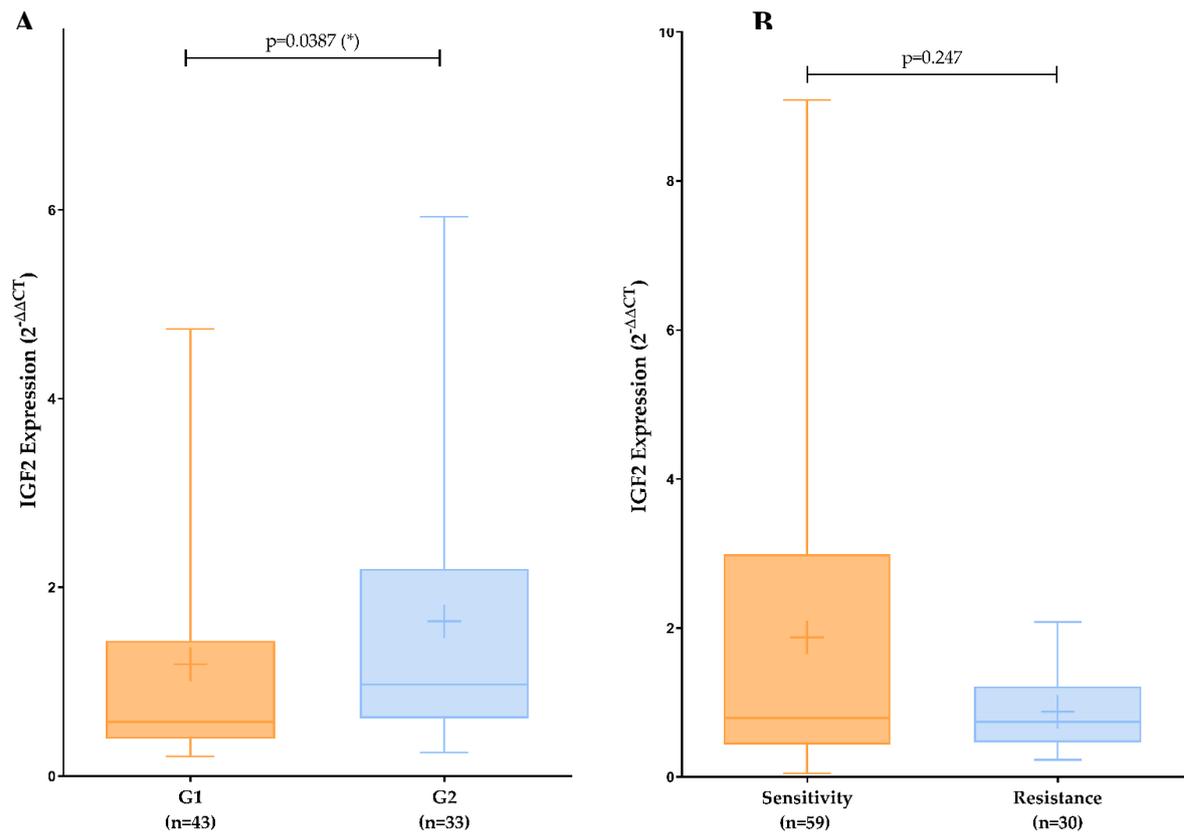


Figura 14: análisis de expresión de IGF2 comparando agresividad (A) y respuesta a tratamiento (B).

Asociación de miRNAs con variables clínicas en pacientes con adenocarcinoma prostático

1. Selección de miRNAs

Se combina el análisis bioinformático de los miRNAs más apropiados según las publicaciones consultadas en PubMed con los términos de búsqueda: biomarcadores, agresividad del cáncer y CP. Se seleccionan 8 miRNAs para el análisis experimental en tejido fresco prostático y plasma de muestra sanguínea periférica. De los resultados bioinformáticos se seleccionaron aquellos miRNAs con una mayor expresión diferencial; y todos aquellos miRNAs en una posición alta en estos valores de expresión y con un rol confirmado en cáncer o desarrollo de CP. Por lo tanto, se incluyen en el análisis miR-592, miR-23c, miR-93-5p, miR-210-3p, miR-141, miR-375, miR-130b y miR221-3p.

2. Análisis bioinformático

2.1.- TCGA del CP

TCGA presenta resultados de varios miRNAs que se han visto sobre-expresados e infra-expresado en relación a la agresividad del CP y más concretamente con la escala de Gleason. Las categorías fueron definidas como: G0 o muestras sin tumor, G1 o muestras con Gleason igual o inferior a 7 (285 casos) y G2 o Gleason por encima de 7 (195 casos). Se eliminan aquellos miRNAs con muy baja expresión, es decir, aquellos miRNAs que no llegan a un porcentaje por cada millón en un mínimo de 51 muestras. Usando este filtro, se eliminan 1564 miRNAs del análisis de los iniciales 2095. Las muestras se normalizan utilizando los valores M (TMM). El análisis se realiza comparando de 3 formas: G0 frente a G1, G0 frente a G2 y G1 frente a G2. En el análisis destacan los miRNAs con expresión diferencial al comparar G0 frente a G2: como miR-891a-5p, miR-23c, miR-93-5p, miR-145-3p y miR-221-3p. También se encuentran diferencias al

comparar G1 frente a G2 en la expresión de: miR592, miR-508-3p, miR-210-3p, miR-514a-3p y miR509-3p como puede apreciarse en la tabla 13.

Tabla 13: miRNAs candidatos como marcador pronóstico según el análisis bioinformático.

miRNA	logFC	logCPM	F	Valor P	FDR
miR-592	2.00060327664328	1.53539364986083	150.591913985462	1.14192130673887e-30	6.06360213878338e-28
miR-508-3p	-3.41187237568967	4.24328481634918	135.349097818851	4.85900935471597e-28	1.29006698367709e-25
miR-210-3p	1.45741325669227	6.6973391648792	109.569020417447	1.89422504011634e-23	3.35277832100593e-21
miR-514a-3p	-2.66782457472627	2.33650737252948	103.891532990085	2.06217656794917e-22	2.73753939395252e-20
miR-509-3p	-2.73042749468782	1.78288809259728	98.3076092838881	2.20640962368312e-21	1.95267251695956e-19
miR-708-5p	0.729374831003158	3.17900616792385	86.7987897700295	3.13431070451193e-19	2.37759854870833e-17
miR-425-5p	0.588845345552985	6.62453533227974	71.2841723130477	2.93140351163739e-16	1.94571908084932e-14
miR-133b	-	4.63985056019902	60.1119701138465	4.56314498473059e-14	1.86386922068611e-12
miR-133a-3p	0.754744025570193	7.09253892936705	55.6548822296071	3.52380387774595e-13	1.24742657272207e-11
miR-217	0.798521198769609	4.55998402785382	54.5148278379028	5.96134087141451e-13	1.97842000170069e-11
miR-137	1.78649848409079	1.75870748262139	51.9390890274383	1.96405023306562e-12	5.79394818754359e-11
miR-653-5p	0.616483000861465	1.33175128664773	50.4721168636983	3.88401312270982e-12	1.08547945692575e-10
miR-221-5p	-1.00961461570179	1.10963023936036	46.7004190026694	2.26367345985694e-11	5.46368457810925e-10
miR-7641	-1.3336882131181	-	44.8752010054738	5.33928291727827e-11	1.23267792568468e-09
miR-1-3p	-0.59135515805922	7.95866249197264	43.9446797733298	8.28024757695005e-11	1.75872458534419e-09
miR-6715b-3p	-1.23979892861597	1.16284138569093	40.6496594725	3.94451999767334e-10	7.48050042415908e-09
miR-301a-5p	0.645619155790705	0.497697877110999	40.5711946054415	4.09448906988449e-10	7.49715067623678e-09
miR-129-5p	0.927484242217699	1.88325453098638	38.0778727130421	1.3448764537408e-09	2.23165436542615e-08
miR-4449	-1.28009712232083	0.805609288030023	36.4235770087606	2.97193001782091e-09	4.641455410185e-08
miR-216a-5p	0.828913102074142	0.039595488161815	35.5550265108091	4.51216696860728e-09	6.84560188665847e-08
miR-5680	0.764440072670008	0.416535848499882	34.3492713488792	8.06825933462853e-09	1.19006825185771e-07
miR-449a	1.20256037766207	0.976022457008567	29.5419633887879	8.33402830053313e-08	1.02915558781002e-06
miR-23c	-0.90493842599123	0.439426558576396	28.1983990814482	1.60926740883171e-07	1.81812977465881e-06
miR-1298-5p	1.10526608285392	0.606764030532924	27.7325380761208	2.0228802765248e-07	2.23781130590556e-06
miR-378d	-	0.342848211551766	25.9886971449324	4.77570565746372e-07	4.69611056317266e-06
miR-1911-5p	0.905738586863382	1.19533139493832	21.3712432997847	4.75116870338604e-06	3.9419852835906e-05
miR-503-5p	0.612614344406672	1.16875718010721	21.193728876652	5.1936390424107e-06	4.17851868412134e-05
miR-490-3p	-1.06306213965183	1.10599847228215	19.4735890554182	1.23459912338361e-05	8.85908289887428e-05
miR-6510-3p	-	2.76146212094461	18.341727273823	2.18953947118483e-05	0.000143662274850965
miR-891a-5p	-	4.08684108335477	16.8523609972146	4.67293318773968e-05	0.000269709513335845
miR-206	-1.64962941110084	6.54298016178287	16.4563302818782	5.72145004969491e-05	0.000320993335000891
miR-1298-3p	0.694513390879086	0.633749184015585	13.3059382065807	0.0002905166639704	0.0013298650738645
miR-184	-	1.84370029674049	12.2845790457701	0.000495096942573267	0.00210317181205124

Las muestras que se analizan con CP (G1 y G2) tienen una expresión diferencial clara con respecto a aquellas que no presentan tejido tumoral (G0). Sin embargo, no hubo demasiada dispersión en los datos de expresión en tejido con escala de Gleason ≤ 7 (G1) frente aquellos con escala Gleason >7 (G2). La mayoría de las muestras G1 estaban más cerca de las muestras G0 como se puede apreciar en la figura 15.

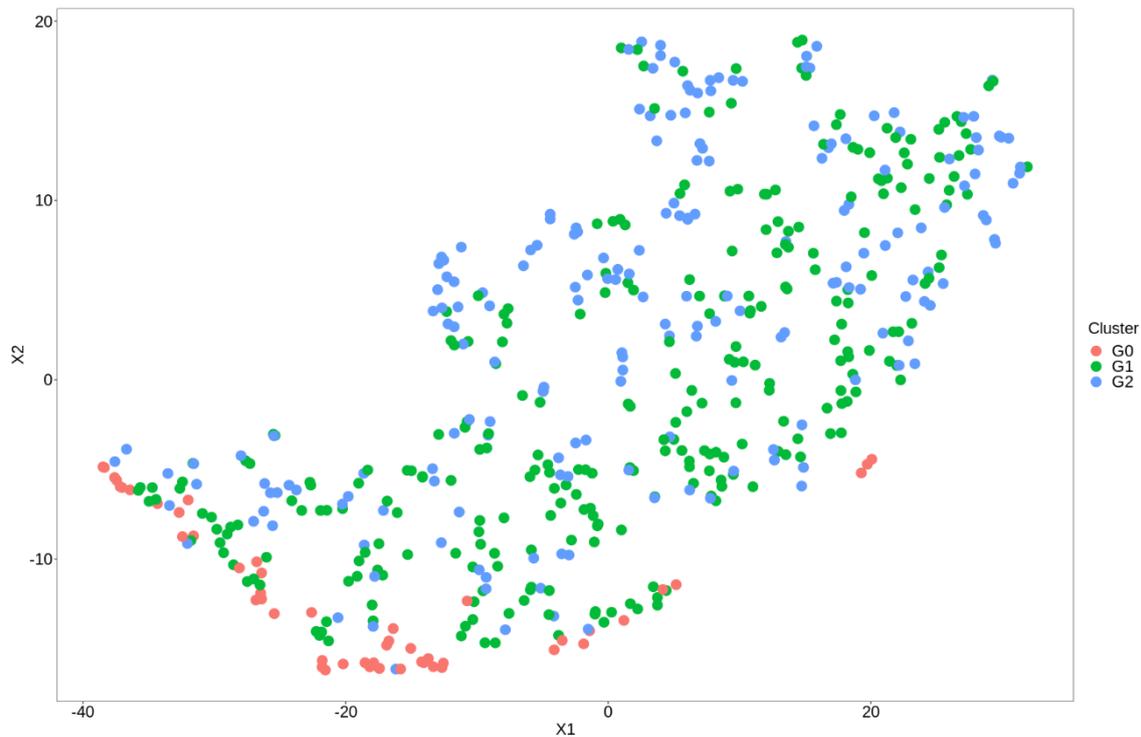


Figura 15: Análisis con PCA de la dispersión de la Expresión de los miRNAs

2.2 Análisis de expresión diferencial

Al realizar el análisis de ED encontramos que el 9.7% de todos los miRNAs son comunes cuando comparamos el grupo de tejido sano con los tumorales. La mayor diferencia en la expresión se encuentra cuando comparamos tejido sano prostático (G0) frente a tejido tumoral con escala de Gleason >7 (G2); como se aprecia en el diagrama de Venn de la figura 16.

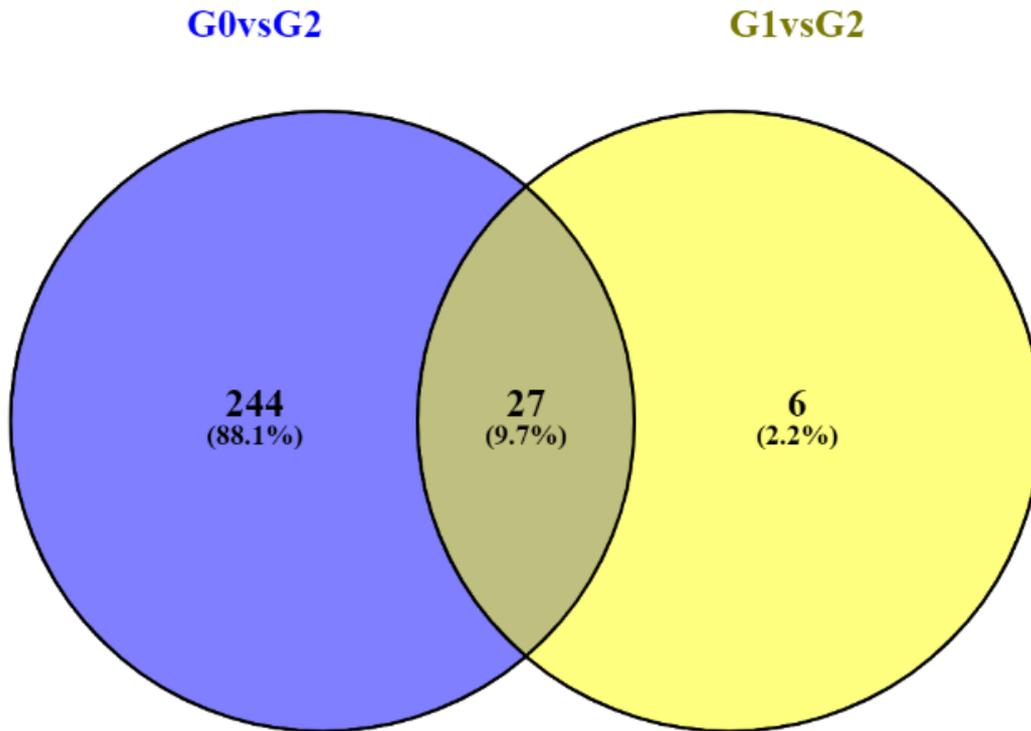


Figura 16: Diagrama de Venn de análisis de ED entre grupo tumoral y no tumoral. La intersección muestra los miRNAs que se expresan en común.

El *Volcano Plot*, que aparece en la figura 17, es una representación gráfica de la dispersión de los miRNAs en función de su patrón de expresión, utilizando logFC (eje X) frente a la significación estadística FDR (eje Y). El color azul representa aquellos miRNAs que no se expresan de forma diferencial en contraste con aquellos que si presentan expresión diferencial en rojo. En el lado izquierdo del diagrama se encuentran los miRNAs infra-expresados y en el lado derecho los sobre-expresados. Además, los miRNAs que se encuentran en la parte superior del eje Y presentan mayor significancia estadística. Se incluye el diagrama que compara G0 frente a G2 (figura 17) en el que se puede apreciar que miR-23-c y miR-221-3p se encuentran infra-expresados en G2; y miR-93-5p, miR-375, miR-141-3p y miR-592 se encuentran sobre-expresados en el grupo G2 frente a G0.

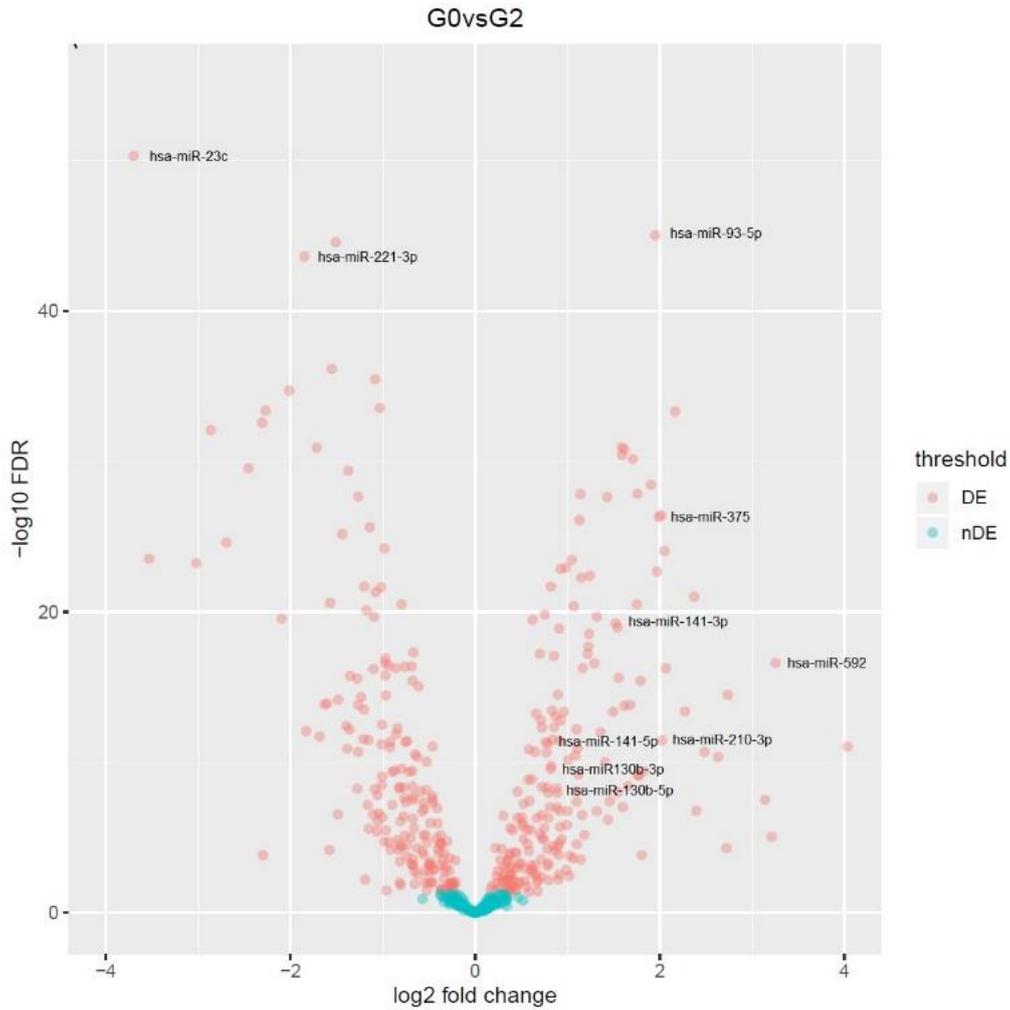


Figura 17: Volcano Plot que compara muestras no tumorales (G0) frente a puntuación Gleason >7 (G2) en análisis bioinformático.

También se realiza la comparación G1 frente a G2 como se puede apreciar en la figura 18. En esta última se señalan con un círculo los miRNAs con mayor importancia en los que se aprecia que miR-23c se encuentra infra-expresado en G2 frente a G1 mientras que miR-592 y miR-210-3p se encuentran sobre-expresados.

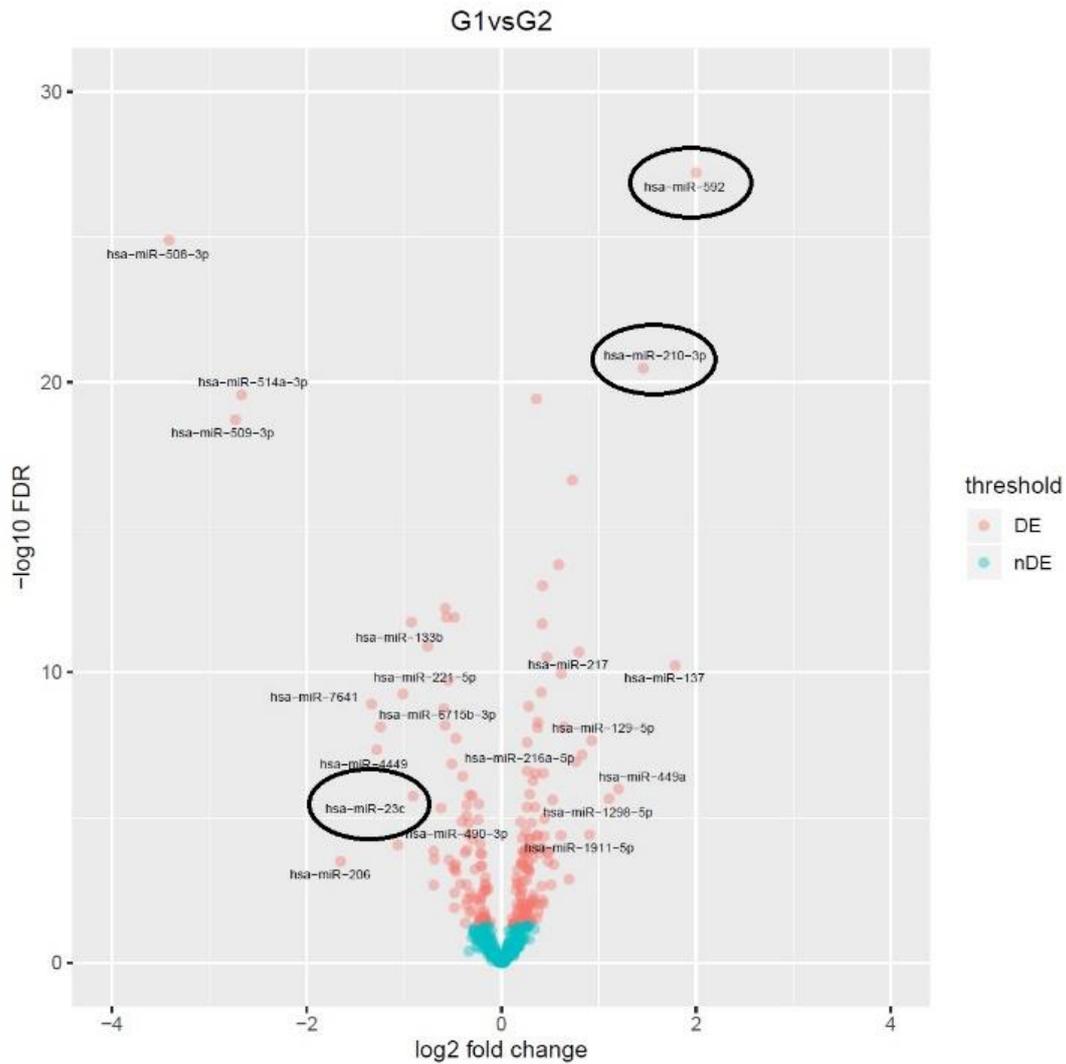


Figura 18: Volcano Plot que compara muestras con Gleason ≤ 7 (G1) frente a puntuación Gleason > 7 (G2) en análisis bioinformático.

3. Análisis molecular

Se validan en nuestras muestras los miRNAs con mayor evidencia en CP, bien según publicaciones o bien por los análisis bioinformáticos previos. Para ello usamos una cohorte de 159 muestras de tejido y 60 muestras de plasma. Los datos clínicos de los pacientes de los que se obtienen estas muestras se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Descripción de las variables clínicas de las muestras.

Variables	Pacientes
Edad media (años)	69.11
Rango de edad total	48-88
PSA debut (ng/ml)	
> 4 ≤ 10	72 (55.0%)
> 10 a ≤20	24 (18.3%)
> 20	35 (26.7%)
Escala de Gleason	
≤ 7	110 (84%)
>7	21 (16%)
Estadio T	
T1-T2	119 (91.54%)
T3-T4	11 (8.46%)
Pérdidas	1
Riesgo D'Amico	
Bajo	46 (35.38%)
Medio	43 (33.08%)
Alto	41 (31.54%)
Pérdidas	1
Seguimiento (meses)	
Media	32.17
Rango de seguimiento	0-54
Pérdidas	8

Aunque algunos de estos miRNAs, como miR-141, miR-375 y miR-130b, no presentaron posiciones relevantes en el estudio bioinformático, se incluyen por tener valores de sobre-expresión logFDR. Sin embargo, estos miRNAs son algunos de los más importantes de acuerdo a las publicaciones previas (156,227–230).

Aunque experimentalmente no se puede probar ningún valor estadísticamente significativo al comparar con parámetros clínicos como PSA, escala Gleason, estadio T y riesgo D'Amico.

Los patrones de expresión en el estudio bioinformático en TCGA y nuestra cohorte experimental coincidieron en la expresión de todos los miRNAs salvo en miR-212-3p y miR-23c, como se puede apreciar en las figuras 19 y 20.

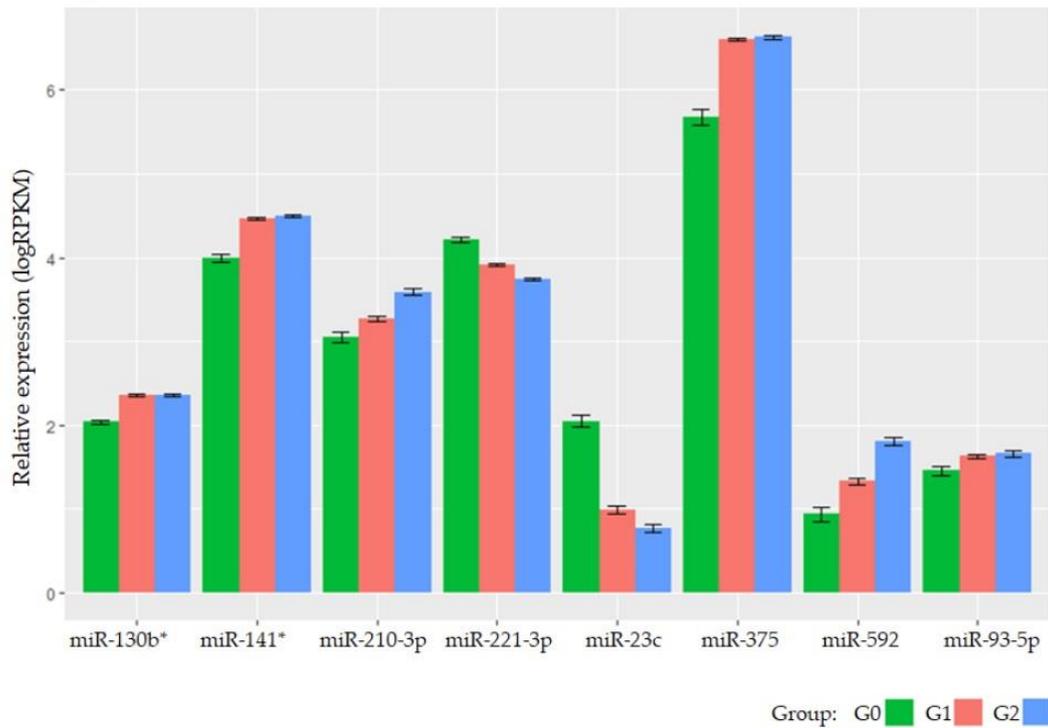


Figura 19: Comparativa bioinformática de expresión relativa de miRNA entre los grupos de agresividad.

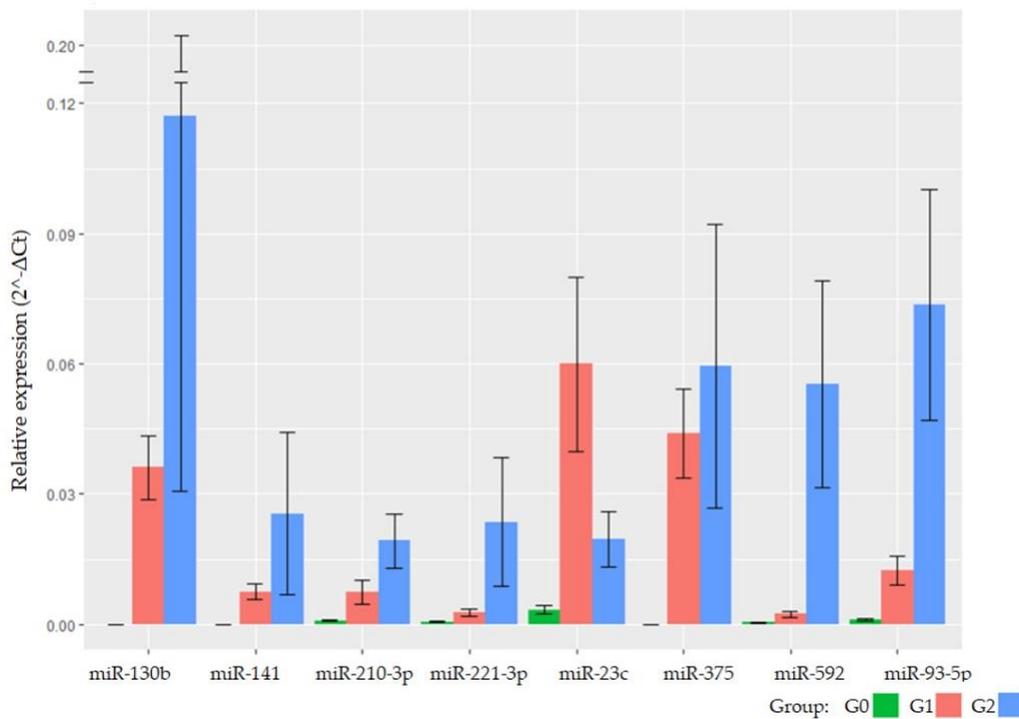


Figura 20: Comparativa en análisis molecular de expresión relativa de miRNA entre los grupos de agresividad.

En función del análisis de miRNAs en TCGA, se desarrollan 2 grupos.

El primero de ellos incluye miR-210-3p, miR-23c y miR-592 que presentan concordancia entre el análisis experimental y bioinformático. Estos 3 miRNAs presentan un valor interesante en torno a la agresividad del CP en la comparación de G1 frente a G2 ($p=1.89 \times 10^{-23}$). Este patrón se mantiene en los estudios de qPCR de las muestras de la biopsia ($p=0.001$). En el caso de miR-23c y miR-592 los patrones de expresión se mantienen entre G1 y G2, pero sin alcanzar valores significativos. Sorprendentemente al comparar G0 con G1 y G0 con G2, encontramos en miR-23c un gran cambio con respecto a los datos del análisis de TCGA. Además, miR-592 podría utilizarse como un marcador de seguimiento, ya que presenta la misma tendencia en el análisis TCGA y muestra réplica en qPCR, pero su baja expresión dificulta la detección en muestras de plasma obtenidos de sangre periférica.

El segundo grupo se halla formado únicamente por miR-93-5p que muestra los mismos patrones en los análisis bioinformáticos de TCGA que el análisis experimental de qPCR

en todas las comparativas. Sólo miR-93-5p y miR-210-3p son los miRNAs con la mayor significación estadística para su uso como biomarcadores diagnósticos.

A la hora de encontrar el marcador más útil para la biopsia líquida, se creía que miR-93-5p sería la mejor opción. Como se menciona previamente, siguió los mismos patrones en los análisis de TCGA y qPCR y en todas las muestras y detectado en muestras de sangre presentando valores estadísticamente significativos en la mayoría de los análisis.

3.1.-Análisis miR-93-5p

Se realizan análisis en plasma y muestras de tejido prostático y se compara la expresión de miR-93-5p en los grupos G1 y G2, se obtiene que se encuentra sobre-expresado en relación a una mayor escala Gleason, de la misma forma que se obtuvo en el análisis TCGA. En la figura 21 se puede ver como la expresión miR-93-5p se modifica en función de la escala Gleason. Además, miR-93-5p sigue el mismo patrón de expresión tanto en plasma como el tejido prostático.

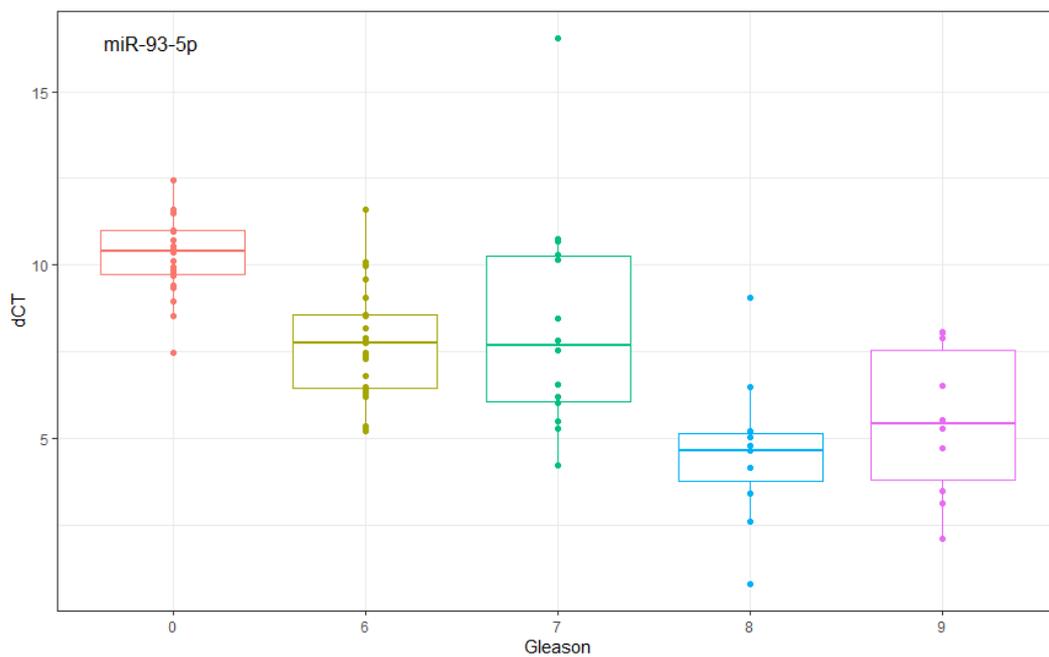


Figura 21: Análisis de expresión de miR-93-5p con respecto a la escala Gleason.

3.2.-Análisis *in silico* de miRNAs

Para identificar los posibles genes diana de los miRNAs que se asocian con agresividad y diagnóstico (miR-210-3p, miR-23c, miR-592 y miR-93-5p); se realiza una predicción integral utilizando 2 bases de datos: *Mirtarbase* y *MiRWalk3.0*. Se identifican los genes dianas de estos miRNAs en ambos programas predictivos y se seleccionan aquellos genes especialmente relacionados con procesos carcinogénicos.

Se realiza un análisis siguiendo al anterior con *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), *STRING* y *DAVID Bioinformatic Resources v6.8*. Se obtiene el papel del conjunto de genes, la relevancia clínica, ontología y las vías metabólicas implicadas. Se identifican 2 genes diana de miR-93-5p que son STAT3 e IGF2 que pueden estar en relación al desarrollo y progresión del CP. En la figura 22 se muestra la interacción de ambas vías.

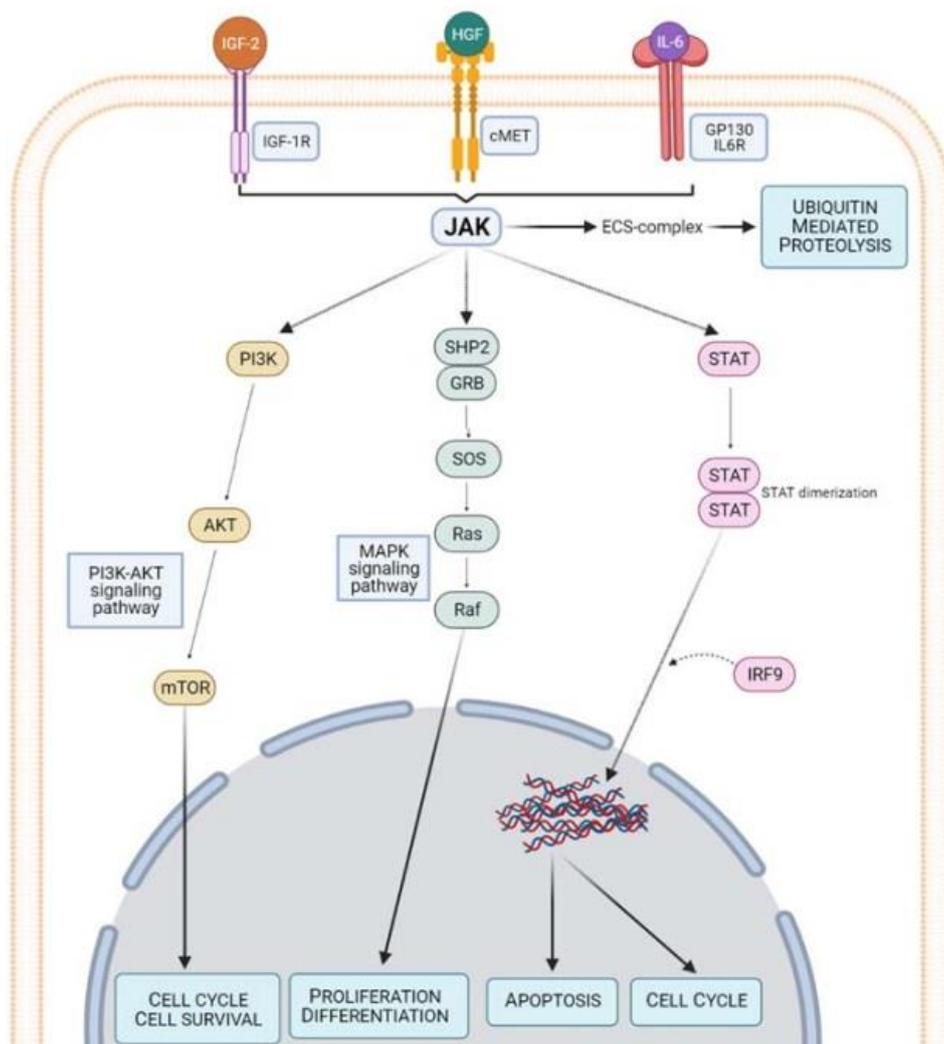


Figura 22: Vía de señalización JAK-STAT.

Discusión

Sobre la implicación de IGF2 en CP

En este estudio se analiza el papel de IGF2 en la carcinogénesis en pacientes con adenocarcinoma prostático. En este caso se ha realizado un estudio en 2 fases: análisis bioinformático en base de datos de expresión genética y confirmación molecular de los análisis bioinformáticos realizados.

Actualmente, con el avance de las tecnologías que involucran la secuenciación del DNA y microarrays, basadas en las tecnologías de nueva generación; ha conducido a la producción de bases de datos de alta producción molecular. Dichas bases de datos han aumentado y desarrollado en los proyectos biomédicos. Además, la gran cantidad de datos genómicos que se han almacenado en bases de datos públicas como: Gene Expression Omnibus (GEO), TCGA y el NCI Genomic Data Commons (GDC), entre otras, se han convertido en uno de los recursos mayor valor en las bases de datos o incluso para probar datos experimentales en cohortes más grandes(231).

Todas las bases de datos en conjunto con los análisis bioinformáticos, hacen posible que cada vez se puedan incluir mejores y de datos de más fácil acceso en la investigación clínica. En este documento profundizamos en la importancia de la informática a través del uso de la base de datos TCGA en busca de biomarcadores genéticos en CP.

El CP es una enfermedad genéticamente heterogénea. Existe como consecuencia una elevada variabilidad clínica y respuestas diferentes a un mismo tratamiento según cada paciente. Dicha variabilidad no solo se refleja en diferencias étnicas sino en diferencias entre los individuos de una misma población(232). Además, las variables clínicas que se emplean actualmente podrían llevar a la clasificación errónea de los pacientes y al sobre o infra-tratamiento de los mismos(233). Por ello, resulta imprescindible el desarrollo de nuevas herramientas que mejoren el diagnóstico y clasificación de los pacientes, y los marcadores genéticos podrían ser la herramienta adecuada. El estudio de las variantes genéticas en el laboratorio junto con el apoyo bioinformático puede ofrecer la incorporación de marcadores genéticos que faciliten las decisiones clínicas.

En primer lugar, nuestro estudio bioinformático en la base de datos de adenocarcinoma prostático en TCGA concluye que IGF2 es uno de los genes más expresados en las muestras de tejido prostático. El rol fisiopatológico de IGF2, así como su dependencia de la hormona del crecimiento, son temas aún controvertidos. Tanto IGF1 como IGF2 activan a un receptor común conocido con IGF1R, que al activarse estimula rutas mitogénicas, antiapoptóticas y proliferativas (234). Por este motivo se ha confirmado el rol de IGF2 en varios tumores como el cáncer de pulmón y el tumor fibroso solitario (235,236). La sobreexpresión de la IGF2BP2 se ha asociado con un peor pronóstico en numerosos tipos de cáncer como la leucemia mielocítica, cáncer de mama, carcinoma esofágico, glioma de bajo grado, hepatocarcinoma, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, adenocarcinoma ductal pancreático y carcinoma de vesícula biliar (237). Además, los inhibidores de IGF1R se han sugerido como fármacos anticancerígenos debido a su efecto inhibitor sobre la proliferación celular (238).

No existen muchos estudios sobre el papel de IGF2 en CP, pero trabajos previos han destacado el papel de IGF2-mRNA y su péptido en CP, que disminuye hasta un 80% en CP en comparación con tejido no tumoral adyacente al tumor (239). Existen evidencias también que incluyen el patrón de sobre-expresión de la proteína IMP3 en CP. Dicho patrón conlleva un peor pronóstico en los pacientes portadores (179).

En este trabajo se presenta una disminución de la expresión de IGF2 en pacientes que responden menor tiempo al tratamiento con TDA en comparación a aquellos pacientes más sensibles. Además, la expresión de IGF2 aumenta en pacientes con escala de Gleason >7 en comparación con los controles o con pacientes con Gleason ≤ 7 . Este hecho hace que IGF2 pudiera utilizarse con biomarcador de agresividad de CP.

A continuación, realizamos un análisis del gen IGF2 en busca de la línea germinal y somática de mutación en torno al CP. Se sabe que el efecto de las mutaciones somáticas y de las variantes germinales es relevante en CP. El efecto combinado de las variantes germinales que alteran la estructura, expresión o de la función de la proteína codificada de los genes relacionados con el cáncer determina qué y cuántas mutaciones somáticas pueden ocurrir para que se produzcan transformaciones malignas, por ello se han analizado también dichas variantes (240). En cuanto a las mutaciones somáticas, encontramos que rs758164144 se presenta predominantemente en pacientes con Gleason ≤ 7 en comparación con rs3842753 que se agrupa en puntuaciones Gleason >7 . Es la

primera vez que la variante rs758164144 y rs3842753 se describen en CP, ya que la variante rs3842753 sólo había sido descrita previamente en diabetes (241).

Entre las variantes germinales, rs1004446 es la más importante en el análisis bioinformático y además se encuentra ligado al rs3741211. Este SNP se había asociado a aumento del riesgo de cáncer de endometrio, la supervivencia en CP o en Diabetes Mellitus tipo 1 (181,242). No existen sin embargo muchos detalles de su efecto en CP. Por ese motivo se ha desarrollado el análisis en esta tesis, en muestras de sangre periférica para su evaluación en relación a la agresividad y la respuesta a tratamiento, pero no se obtuvo ningún resultado estadísticamente significativo.

Además, al realizar el análisis informático de expresión, se descubre que los genes Neuropilin-2 (NRP2) y el Receptor del Dominio de Kinasa insertada (KDR) tienen las posiciones más importantes para la búsqueda de marcadores de cribado. NRP2 es un miembro de la familia de los receptores del Neuropilin y se ha demostrado que regula la autofagia y la señalización mTORC2 en CP. Se ha identificado como un marcador de mal pronóstico en pacientes con CP de alto riesgo (243). Existen datos escasos en relación al CP, pero en cáncer de vejiga existe un peor pronóstico entre los pacientes con alta expresión de NRP2, NRP1, PDGFC y PDGFD. Los datos de este estudio presentan resultados similares a los escritos en cáncer de vejiga.

En cuanto al KDR, se establece como un importante marcador de cribado y tratamiento en CP. No existen muchos estudios que relacionen el gen KDR con CP. En el estudio realizado por A.Fraga et al. se demostró que el cambio de una timina por citosina en la posición 604 de KDR aumentaba los niveles de esta proteína, que podría generar un ambiente de activación de vías de señalización de hipoxia en CP (244). En el cáncer colorrectal se ha establecido una asociación significativa entre la expresión KDR y el estadio de la enfermedad, así como la afectación ganglionar (245). En esta tesis doctoral se establece un aumento de la expresión de KDR en pacientes con CP frente al grupo control y una ED para el manejo del tratamiento. Por otro lado, demostramos que el mejor biomarcador para distinguir la agresividad y la respuesta a tratamiento es IGF2 a través del estudio de su expresión. Aunque no se alcanzan valores significativos en el análisis molecular, se obtiene una tendencia a la significación de la misma forma que se obtiene en el análisis bioinformático previamente realizado: Los pacientes con resistencia al tratamiento con TDA tienen tendencia a infra-expresar IGF2 frente aquellos sensibles. De

la misma forma los pacientes con Gleason >7 tienen tendencia a sobre-expresar IGF2 frente aquellos con escala Gleason ≤ 7 .

Sobre el uso de miRNAs como biomarcadores en CP

Existe mucha investigación en torno a la búsqueda de una molécula estable que ayude en el manejo del CP. Los análisis sobre los miRNAs han mostrado resultados importantes, como el uso de miRNAs en exosomas provenientes de semen (miR-142-3p, miR-142-5p y miR-223-3p) como modelo de biomarcadores moleculares para mejorar el diagnóstico y pronóstico del CP (246). También se ha investigado el uso de miR-17, miR-20a, miR-20b y miR-106a en sangre para distinguir a pacientes de alto y bajo riesgo tras prostatectomía radical (247). Otros estudios han analizado el uso como biomarcador no invasivo de miRNAs en exosomas urinarios como miR-196a-5p y miR-501-3p (248). La estabilidad de los miRNAs combinada con el aumento de las metodologías para su estudio y su papel fundamental en numerosas vías regulatorias como la EMT, angiogénesis, metástasis y resistencia tratamiento; hacen de los miRNAs uno de los biomarcadores más prometedores en CP (249).

La biopsia líquida es uno de los aspectos más estudiados en la investigación actual con el objetivo de que se pueda aplicar en el ámbito clínico. La ventaja de la biopsia líquida frente a las muestras de tejido, es que presentan mínima invasión y daño al paciente, tiene la oportunidad de repetirse y representa una parte de todo el tumor. La biopsia líquida puede suponer un punto especialmente importante cuando existe acceso limitado a la biopsia del tejido, presentando un aumento de ventajas en la medicina de precisión para su aplicación directa en la práctica clínica. Además, el CP es un tumor heterogéneo en el que existen discrepancias entre los datos publicados. Por lo tanto, un análisis profundo que combine la bioinformática y un análisis molecular experimental puede ser la prueba para mejorar el uso de miRNAs como biomarcadores de CP (250,251).

El análisis bioinformático que se realiza en esta tesis muestra resultados importantes de algunos miRNAs como miR-891a-5p, miR-23c, miR-93-5p, miR-145-3p y miR-221-3p al comparar las expresiones en muestras que no tienen tumor frente las tumorales con Gleason >7. También se ven resultados en miR592, miR-508-3p, miR-210-3p, miR-514a-3p y miR509-3p al comparar expresión entre los grupos G1 y G2 en las muestras tumorales. Sin embargo, no todos ellos presentan un rol importante en la carcinogénesis

del CP como son miR-891a-5p, miR-145-3p, miR-508-3p, miR-514a-3p o miR-509-3p por lo que se descartaron del análisis molecular.

El resto de miRNAs se seleccionaron ya que mostraban una gran relación al riesgo o agresividad del CP en publicaciones o en análisis bioinformático en sí. En esta tesis, algunos miRNAs como miR-141, miR-375 y miR-130b pierden interés como biomarcadores al realizar el análisis de expresión ya que no existen diferencias significativas en el riesgo de CP ni en el pronóstico. Por el contrario, al revisar la literatura estos miRNAs han sido señalados como los más susceptibles para ser biomarcadores urinarios en el diagnóstico y progresión del CP, en plasma para el tiempo a la progresión hacia CPRC metastásico o biomarcador de cribado, o incluso se han asociado al riesgo de recurrencia bioquímica. Por contraste, al realizar el análisis bioinformático esto 3 miRNAs: miR-141, miR-375 y miR-130b pierden por completo su fuerza estadística (146,155,156,227,252–254).

Al comparar el resto de posibles miRNAs susceptibles de ser utilizados como biomarcadores, el análisis bioinformático desvela que miR-93-5p, miR-23c, miR-210-3p, miR-221-3p y miR-592 han sido evaluados para tener un rol importante en el cribado de CP, agresividad, recurrencia o incluso como origen etiológico (255–259). Estos miRNAs han sido estudiados como carcinogénicos en cáncer de endometrio, osteosarcoma, hepatocarcinoma, carcinoma renal y otro tipo de tumores (260–268). El análisis experimental muestra a miR-210-3p, miR-23c y miR-592 como marcadores de agresividad en CP y miR-93-5p, miR-130b y miR-141 como marcadores diagnósticos en este tumor. En el caso de miR-210-3p se encuentra sobre-expresado en pacientes con Gleason >7 frente aquellos con Gleason \leq 7, este hecho se mantiene en el análisis bioinformático, pero también en el análisis experimental con qPCR en las muestras de tejido prostático. De la misma forma ocurre con miR-23c y miR-592 sin llegar a alcanzar cifras significativas, pero con la misma tendencia.

Además, se pueden seleccionar miR-210, miR592 y miR-93-5p como posibles marcadores no invasivos. Estos miRNAs demostraron utilidad como marcadores no invasivos tanto en el análisis bioinformático en TCGA, como en el análisis en tejido y plasma de sangre periférica. Una posible limitación sobre los datos de esta tesis en miR-210-3p y miR-592 puede ser la falta de muestra de sangre periférica; por lo que su utilidad como marcadores no invasivos debe ser ampliada por otros estudios. Además, miR-592 presenta la particularidad de que podría utilizarse como marcador de seguimiento de

tratamiento, pero su baja expresión dificulta su obtención en plasma de sangre periférica, como se ha visto en esta tesis.

Pero el posible miRNA que más fiabilidad podría dar como biomarcador no invasivo es miR-93-5p, ya que los datos publicados previamente indicaban el papel de miR-93-5p en la predicción de la agresividad y la precisión diagnóstica en la biopsia líquida o su relación con la diseminación linfática (255,257). Este estudio refuerza el papel de miR-93-5p como biomarcador en CP porque tanto en el análisis bioinformático como experimental existen los mismos patrones, el miR-93-5p se sobre-expresa en puntuaciones Gleason altas. Este miRNA se relaciona con los genes IGF2 y STAT3 según la predicción integrada. Ambos genes presentan efectos oncogénicos conocidos, como la resistencia a la activación IGF2 acetilada mediada por STAT3 de la transcripción en los inhibidores de la deacetilasa de histona (HDI) descrita en el cáncer de pulmón no-células-pequeñas (260,269,270).

Existe algo de evidencia en CP, como el papel de la proteína conectora del mRNA de IGF2 tipo 3 (IMP3) que se ha visto que produce una aceleración en la progresión del CP a través de la activación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR a través del aumento de SMURF-1 a través de la ubiquitinación de PTEN. Estos datos refuerzan el prometedor uso de miR-93-5p como un biomarcador en CP. Este marcador sólo había sido sugerido por el análisis bioinformático del estudio de Y.Yang et al (179,271).

Además, se ha demostrado que miR-93-5p en hepatocarcinoma se une a la región 3' no traducida (UTR) a la proteína quinasa 2 mitogénica activada (MAP3K2). MAP3K2 sobre-regula su expresión e infra-regula p38 y la vía c-Jun N-terminal quinasa (JNK). Todas estas vías que se conectan llevan a un aumento del ciclo celular en hepatocarcinoma y puede explicar su papel en CP (272). Por otro lado, se ha descrito que AHNAK es un gen objetivo de miR-93-5p. Este gen codifica una enorme proteína de armazón que ha sido identificada como un supresor de tumores y está ampliamente relacionada con las metástasis tumorales. Se ha sugerido que AHNAK tiene un papel inhibitorio de la migración, invasión y de EMT en cáncer. A través de esta tesis se puede suponer que miR-93-5p puede estar involucrado en el proceso de invasión, migración o EMT en CP. La función de miR-93-5p también ha sido descrita en cáncer gástrico, hepatocarcinoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas (273). Se sugirió previamente por Yang K *et al.* que indicaron que miR-93 podría actuar como un promotor tumoral en CP al deshabilitar a la proteína homóloga 2 (274). Por otro lado, Wang C. *et al.* encontraron que

miR-93 podrían promover la proliferación e invasión de CP a través de provocar la sobre-expresión de los genes TGFBR2, ITGB8 y LATS2 (275).

En contraste a la abundancia de información de miR-93-5p, sólo existe una publicación que se refiera al papel de miR-23c en el CP. Esta publicación sugiere que tiene un papel en la latencia tumoral (276). Otros estudios sugieren que puede suponer una diana terapéutica en el cáncer de ovario, y estar implicado en la regulación molecular del cáncer de endometrio o del hepatocarcinoma (260,262,263). Según la vía KEGG, miR-23 sobre-expresa los genes MAPK1 y FGFR3 en cáncer de vejiga. Ambos genes han sido estudiados por su papel en la proliferación a través de la interacción con la vía RAS-MAPK. Estos genes tienen un papel potencial como carcinogénicos en muchos tipos tumorales, de hecho, MAPK1 está alterado en 0.82% de todos los tumores (277). Aunque existen escasos datos sobre miR-23c y su relación con el CP, son lógicos los resultados obtenidos en este estudio sobre su utilidad como biomarcador de agresividad. De acuerdo al *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, en los tumores prostáticos los niveles de MAPK estaban incrementados en las puntuaciones Gleason altas y en los estadios tumorales avanzados, mientras que el tejido prostático no tumoral presentaba poca o ninguna expresión de quinasa que activa MAPK (278). Dichos datos coinciden con los resultados obtenidos que relacionan miR-23c con el CP en esta tesis doctoral.

Otro de los biomarcadores sugeridos en esta tesis es miR-210-3p, que se ha relacionado previamente con la activación de la vía de señalización NF-kB en CP (151). En el caso de miR-592 se había relacionado con la distinción entre los estadios T2c o T3b en CP (279). Estos datos, aunque son escasos, tienen la misma tendencia que nuestro estudio donde los indicamos como posibles biomarcadores de agresividad en CP.

Por último, el análisis bioinformático muestra que miR-200c-3p puede tener un papel como biomarcador de agresividad en CP. Este miRNA había sido señalado previamente como biomarcador de agresividad en CP, a través de la regulación epitelial que lleva a la anticipación de la reprogramación molecular del eje Zeb1-Slug/vimentina. Estudios recientes indicaron el papel de miR-200b-3p/200c-3p y XBP1 en la progresión del CP a través de su función imprescindible en la regulación de la subunidad reguladora de PKA tipo II β (PRKAR2B) (280,281). En esta tesis se encuentra que miR-200c-3p se encuentra entre los mejores situados en el análisis bioinformático en la comparación de muestras

tumorales frente a muestras no tumorales; lo que podría suponer que se tratase de un buen marcador de cribado.

Conclusiones

Sobre la implicación de IGF2 en el CP

1. El gen IGF2 se sobre-expresa en los pacientes con puntuación Gleason >7 frente a las puntuaciones ≤ 7 en las muestras de nuestra población y en el estudio bioinformático. Por ello la expresión de IGF2 puede ser utilizada como un biomarcador de agresividad.
2. El gen IGF2 se sobre-expresa en aquellos pacientes sensibles a TDA durante ≥ 3 años frente aquellos que se vuelven resistentes a castración en < 3 años. Por ello la expresión de IGF2 puede ser utilizada como un biomarcador de sensibilidad a TDA.
3. Se ha evaluado la variante germinal y somática rs1004446 como posible marcador de agresividad o de respuesta a TDA. En este caso sólo se han alcanzado resultados significativos en el estudio bioinformático, pero es necesario un análisis más profundo con mayor número de muestras para mejorar el análisis actual.
4. La variante somática rs758164144 del gen IGF2 se presenta en pacientes con Gleason ≤ 7 frente a la variante 3842753 que se agrupa únicamente en pacientes con puntuación Gleason > 7 . Dichos datos provienen de análisis bioinformáticos y abren una nueva vía de estudio como posibles biomarcadores de agresividad.
5. En el análisis informático se descubre que los genes NRP2 y KDR tienen la posición más importante como marcadores de cribado y de respuesta a TDA. Dicho análisis debe ser analizado junto con análisis molecular para ratificar su utilidad.

Sobre el uso de miRNAs como biomarcadores

1. Tanto en análisis bioinformático como molecular miR-93-5p se sobre-expresa en tejido prostático tumoral frente a tejido sano. Por este motivo miR-93-5p podría ser utilizado como marcador diagnóstico en CP.
2. Tanto en el análisis bioinformático como molecular miR-93-5p se sobre-expresa en puntuaciones Gleason altas. Por lo tanto, miR-93-5p podría ser utilizado como un marcador de agresividad en CP.
3. miR-210-3p se sobre-expresa en pacientes con puntuación Gleason >7 frente a aquellos ≤ 7 tanto en análisis bioinformático como experimental. Este miRNA podría ser utilizado como biomarcador de agresividad.
4. miR-592 puede ser un marcador no invasivo tanto de agresividad como de seguimiento de tratamiento según los datos del estudio bioinformático. Los resultados del estudio experimental siguieron la misma línea que los bioinformáticos, pero no llegó a alcanzarse la significación posiblemente por la falta de muestras de sangre periférica. Este marcador debería ser estudiado en mayor profundidad.
5. En el estudio bioinformático miR-23c se infra-expresa en tejido tumoral frente a tejido sano. No ocurre de la misma forma en el análisis experimental en el que se encuentra sobre-expresado en puntuación Gleason ≤ 7 frente a puntuación >7 y frente a tejido sano. No obstante, dicho miRNA es susceptible de ser estudiado en una muestra mayor para la confirmación de su uso como marcador diagnóstico y de agresividad.
6. Tanto en el análisis bioinformático como experimental miR-141, miR-375 y miR-130b no presentan ninguna relación con el diagnóstico ni pronóstico del CP.
7. El análisis bioinformático muestra que miR-200c-3p podría ser un buen marcador de cribado al encontrarse sobre-expresado en muestra tumorales frente a no tumorales.

Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3).
2. Bell KJL, del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *International Journal of Cancer*. 2015 Oct 21;137(7).
3. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *The Canadian journal of urology*. 2008;15(1).
4. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, Cantalapiedra A, et al. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. *Actas Urológicas Españolas*. 2013;37(1).
5. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019;69(5).
6. Hugosson J, Roobol MJ, Månsson M, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, et al. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer(Figure presented.). *European Urology*. 2019;76(1).
7. Arakelyan GA. 34th annual congress of the european association of urology in 2019: Review of oncological urology topics. *Onkourologiya*. 2019;15(2).
8. Semjonow A, Brandt B, Oberpenning F, Roth S, Hertle L. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostate-specific antigen values. *The Prostate*. 1996;29(S7).
9. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation

- of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *Journal of the American Medical Association*. 1998;279(19).
10. Nordström T, Vickers A, Assel M, Lilja H, Grönberg H, Eklund M. Comparison between the four-kallikrein panel and prostate health index for predicting prostate cancer. *European Urology*. 2015;68(1).
 11. Hessels D, van Gils MPMQ, van Hooij O, Jannink SA, Witjes JA, Verhaegh GW, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate*. 2010;70(1).
 12. van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker–Based Risk Score. *European Urology*. 2016;70(5).
 13. Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A, et al. Variation of Serum Prostate-Specific Antigen Levels. *JAMA*. 2003;289(20).
 14. Drost FJH, Osses DF, Nieboer D, Steyerberg EW, Bangma CH, Roobol MJ, et al. Prostate MRI, with or without MRI-targeted biopsy, and systematic biopsy for detecting prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;2019(4).
 15. van Hove A, Savoie PH, Maurin C, Brunelle S, Gravis G, Salem N, et al. Comparison of image-guided targeted biopsies versus systematic randomized biopsies in the detection of prostate cancer: A systematic literature review of well-designed studies. *World Journal of Urology*. 2014;32(4).
 16. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *New England Journal of Medicine*. 2018;
 17. Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, et al. Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(25).
 18. Shen G, Deng H, Hu S, Jia Z. Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. Vol. 43, *Skeletal Radiology*. 2014.

19. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: A summary of the literature. Vol. 171, *Journal of Urology*. 2004.
20. von Eyben FE, Kairemo K. Meta-analysis of 11C-choline and 18F-choline PET/CT for management of patients with prostate cancer. Vol. 35, *Nuclear Medicine Communications*. 2014.
21. Studenski S, Perera S, Patel K, Rosano C, Faulkner K, Inzitari M, et al. Gait speed and survival in older adults. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2011;305(1).
22. Gleason DF, Mellinger GT, Arduino LJ, Bailar JC, Becker LE, Berman HI, et al. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. In: *Journal of Urology*. 2017.
23. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *American Journal of Surgical Pathology*. 2016;40(2).
24. Brierley J, Gospodarowicz MD, Wittekind CT. *TNM Classification of Malignant Tumors International Union Against Cancer*. 8th. Oxford, England: Wiley; 2017. Oesophagus including oesophagogastric junction. Wiley. 2017;
25. Liu D, Lehmann HP, Frick KD, Carter HB. Active surveillance versus surgery for low risk prostate cancer: A clinical decision analysis. *Journal of Urology*. 2012;187(4).
26. Boyle HJ, Alibhai S, Decoster L, Efstathiou E, Fizazi K, Mottet N, et al. Updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology on prostate cancer management in older patients. Vol. 116, *European Journal of Cancer*. 2019.
27. Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, Li H, Lu-Yao GL. Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(10).
28. Blanc-Bisson C, Fonck M, Rainfray M, Soubeyran P, Bourdel-Marchasson I. Undernutrition in elderly patients with cancer: Target for diagnosis and intervention. Vol. 67, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008.

29. Robinson TN, Wu DS, Pointer LF, Dunn CL, Moss M. Preoperative cognitive dysfunction is related to adverse postoperative outcomes in the elderly. *Journal of the American College of Surgeons*. 2012;215(1).
30. Oken MM, Creech RH, Davis TE. Toxicology and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 1982;5(6).
31. Jonsson E, Sigbjarnarson HP, Tomasson J, Benediktsdottir KR, Tryggvadottir L, Hrafnkelsson J, et al. Adenocarcinoma of the prostate in Iceland: A population-based study of stage, Gleason grade, treatment and long-term survival in males diagnosed between 1983 and 1987. Vol. 40, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2006.
32. Adolfsson J, Tribukait B, Levitt S. The 20-Yr Outcome in Patients with Well- or Moderately Differentiated Clinically Localized Prostate Cancer Diagnosed in the Pre-PSA Era: The Prognostic Value of Tumour Ploidy and Comorbidity. *European Urology*. 2007;52(4).
33. Hayes JH, Ollendorf DA, Pearson SD, Barry MJ, Kantoff PW, Lee PA, et al. Observation versus initial treatment for men with localized, low-risk prostate cancer: A cost-effectiveness analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2013;158(12).
34. Bruinsma SM, Roobol MJ, Carroll PR, Klotz L, Pickles T, Moore CM, et al. Expert consensus document: Semantics in active surveillance for men with localized prostate cancer-results of a modified Delphi consensus procedure. Vol. 14, *Nature Reviews Urology*. 2017.
35. Tosoian JJ, Mamawala M, Epstein JI, Landis P, Wolf S, Trock BJ, et al. Intermediate and longer-term outcomes from a prospective active-surveillance program for favorable-risk prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(30).
36. Lam TBL, MacLennan S, Willemsse PPM, Mason MD, Plass K, Shepherd R, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Prostate Cancer Guideline Panel Consensus Statements for Deferred Treatment with Curative Intent for Localised Prostate Cancer from an International Collaborative Study (DETECTIVE Study). Vol. 76, *European Urology*. 2019.

37. Steineck G, Helgesen F, Adolfsson J, Dickman PW, Johansson J-E, Norlén BJ, et al. Quality of Life after Radical Prostatectomy or Watchful Waiting. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(11).
38. Hatzinger M, Hubmann R, Moll F, Sohn M. [The history of prostate cancer from the beginning to DaVinci]. *Aktuelle Urologie*. 2012;43(4).
39. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(15).
40. Bianco FJ, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: Long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function (“trifecta”). *Urology*. 2005;66(5 SUPPL.).
41. Fossati N, Willemsse PPM, van den Broeck T, van den Bergh RCN, Yuan CY, Briers E, et al. The Benefits and Harms of Different Extents of Lymph Node Dissection During Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Systematic Review. Vol. 72, *European Urology*. 2017.
42. Heemsbergen WD, Al-Mamgani A, Slot A, Dielwart MFH, Lebesque J v. Long-term results of the Dutch randomized prostate cancer trial: Impact of dose-escalation on local, biochemical, clinical failure, and survival. *Radiotherapy and Oncology*. 2014;110(1).
43. Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, Matthews J, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2011;12(5).
44. Matzinger O, Duclos F, Bergh A van den, Carrie C, Villà S, Kitsios P, et al. Acute toxicity of curative radiotherapy for intermediate- and high-risk localised prostate cancer in the EORTC trial 22991. *European Journal of Cancer*. 2009;45(16).
45. Ash D, Flynn A, Battermann J, de Reijke T, Lavagnini P, Blank L. ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer. In: *Radiotherapy and Oncology*. 2000.

46. Machtens S, Baumann R, Hagemann J, Warszawski A, Meyer A, Karstens JH, et al. Long-term results of interstitial brachytherapy (LDR-Brachytherapy) in the treatment of patients with prostate cancer. *World Journal of Urology*. 2006;24(3).
47. Galalae RM, Kovács G, Schultze J, Loch T, Rzehak P, Wilhelm R, et al. Long-term outcome after elective irradiation of the pelvic lymphatics and local dose escalation using high-dose-rate brachytherapy for locally advanced prostate cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2002;52(1).
48. Morote J, Planas J, Salvador C, Raventós CX, Catalán R, Reventós J. Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU International*. 2009;103(3).
49. Bublej GJ. Is the flare phenomenon clinically significant? In: *Urology*. 2001.
50. Seidenfeld J, Samson DJ, Hasselblad V, Aronson N, Albertsen PC, Bennett CL, et al. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 132, *Annals of Internal Medicine*. 2000.
51. Klotz L, Boccon-Gibod L, Shore ND, Andreou C, Persson BE, Cantor P, et al. The efficacy and safety of degarelix: A 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU International*. 2008;102(11).
52. Smith MR, Goode M, Zietman AL, McGovern FJ, Lee H, Finkelstein JS. Bicalutamide monotherapy versus leuprolide monotherapy for prostate cancer: Effects on bone mineral density and body composition. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(13).
53. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(4).
54. Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(8).

55. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(2).
56. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(1).
57. James ND, Spears MR, Clarke NW, Dearnaley DP, de Bono JS, Gale J, et al. Survival with newly diagnosed metastatic prostate cancer in the docetaxel era: Data from 917 patients in the control arm of the STAMPEDE Trial (MRC PR08, CRUK/06/019). *European Urology*. 2015;67(6).
58. Pagliarulo V, Bracarda S, Eisenberger MA, Mottet N, Schröder FH, Sternberg CN, et al. Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer. Vol. 61, *European Urology*. 2012.
59. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;387(10024).
60. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): A randomised, Open-label, Phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2).
61. Sathianathan NJ, Philippou YA, Kuntz GM, Konety BR, Gupta S, Lamb AD, et al. Taxane-based chemohormonal therapy for metastatic hormone-sensitive prostate cancer: a Cochrane Review. Vol. 124, *BJU International*. 2019.
62. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(4).
63. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, et al. Arches: A randomized, phase III study of androgen deprivation therapy with

- enzalutamide or placebo in men with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(32).
64. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2018;392(10162).
 65. Burdett S, Boevé LM, Ingleby FC, Fisher DJ, Rydzewska LH, Vale CL, et al. Prostate Radiotherapy for Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer: A STOPCAP Systematic Review and Meta-analysis. *European Urology*. 2019;76(1).
 66. Smith MR, Kabbinavar F, Saad F, Hussain A, Gittelman MC, Bilhartz DL, et al. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate nonmetastatic prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(13).
 67. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(26).
 68. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(15).
 69. Fizazi K, Shore ND, Tammela T, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. ARAMIS: Efficacy and safety of darolutamide in nonmetastatic castration-resistant prostate cancer (nmCRPC). *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(7_suppl).
 70. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): Final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2).
 71. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(5).

72. Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, Higano C, Basch E, Fizazi K, et al. Trial design and objectives for castration-resistant prostate cancer: Updated recommendations from the prostate cancer clinical trials working group 3. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(12).
73. Smith MR, Cook R, Lee KA, Nelson JB. Disease and host characteristics as predictors of time to first bone metastasis and death in men with progressive castration-resistant nonmetastatic prostate cancer. *Cancer*. 2011;117(10).
74. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, MacHiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *The Lancet*. 2010;376(9747).
75. Radium-223 in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(17).
76. Emmett L, Willowson K, Violet J, Shin J, Blanksby A, Lee J. Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. Vol. 64, *Journal of Medical Radiation Sciences*. 2017.
77. Sandhu SK, Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, et al. PROfound: Phase III study of olaparib versus enzalutamide or abiraterone for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) with homologous recombination repair (HRR) gene alterations. *Annals of Oncology*. 2019;30.
78. Maitland NJ. Stem cells in the normal and malignant prostate. In: *Prostate Cancer: Biochemistry, Molecular Biology and Genetics*. 2013.
79. Xin L. Cells of origin for cancer: An updated view from prostate cancer. Vol. 32, *Oncogene*. 2013.
80. Blackwood JK, Williamson SC, Greaves LC, Wilson L, Rigas AC, Sandher R, et al. In situ lineage tracking of human prostatic epithelial stem cell fate reveals a common clonal origin for basal and luminal cells. *Journal of Pathology*. 2011;225(2).
81. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. Vol. 24, *Genes and Development*. 2010.

82. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2016.
83. Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, et al. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(11).
84. Mehrotra J, Varde S, Wang H, Chiu H, Vargo J, Gray K, et al. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate*. 2008;68(2).
85. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*. 2005;65(23).
86. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330).
87. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. Vol. 481, *Nature*. 2012.
88. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. Vol. 128, *Cell*. 2007.
89. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. Vol. 128, *Cell*. 2007.
90. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer Program in Computational Biology 2 Program in Human Oncology and Pathogenesis (HOPP). *Cancer Cell*. 2010;18.
91. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487(7406).
92. Pellacani D, Kestoras D, Droop AP, Frame FM, Berry PA, Lawrence MG, et al. DNA hypermethylation in prostate cancer is a consequence of aberrant epithelial differentiation and hyperproliferation. *Cell Death and Differentiation*. 2014;21(5).
93. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amissah N, Freeman A, Nariculam J, et al. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene*. 2007;26(45).

94. Navarro JM, Touzart A, Pradel LC, Loosveld M, Koubi M, Fenouil R, et al. Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. *Nature Communications*. 2015;6.
95. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene*. 2010;29(14).
96. Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science*. 2015;349(6254).
97. Bapat SA, Jin V, Berry N, Balch C, Sharma N, Kurrey N, et al. Multivalent epigenetic marks confer microenvironment-responsive epigenetic plasticity to ovarian cancer cells. *Epigenetics*. 2010;5(8).
98. Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*. 2013;339(6119).
99. Gendrel AV, Attia M, Chen CJ, Diabangouaya P, Servant N, Barillot E, et al. Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Developmental Cell*. 2014;28(4).
100. Nag A, Savova V, Fung HL, Miron A, Yuan GC, Zhang K, et al. Chromatin signature of widespread monoallelic expression. *eLife*. 2013;2013(2).
101. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2006;125(2).
102. Vincent A, Kazmierczak C, Duchêne B, Jonckheere N, Leteurtre E, van Seuning I. Cryosectioning the intestinal crypt-villus axis: An ex vivo method to study the dynamics of epigenetic modifications from stem cells to differentiated cells. *Stem Cell Research*. 2015;14(1).
103. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*. 2007;318(5853).

104. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, et al. Downregulation of Death-Associated Protein Kinase 1 (DAPK1) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*. 2007;129(5).
105. Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biology*. 2008;9(5).
106. Kroon P, Berry PA, Stower MJ, Rodrigues G, Mann VM, Simms M, et al. JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer Research*. 2013;73(16).
107. Schroeder A, Herrmann A, Cherryholmes G, Kowolik C, Buettner R, Pal S, et al. Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling. *Cancer Research*. 2014;74(4).
108. Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hsieh WS, Kim WY, Simons JW. Interleukin-6: A candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology*. 1995;45(3).
109. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*. 2011;478(7369).
110. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research*. 2002;62(11).
111. Vindrieux D, Escobar P, Lazennec G. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. Vol. 16, *Endocrine-Related Cancer*. 2009.
112. Strasner A, Karin M. Immune infiltration and prostate cancer. *Frontiers in Oncology*. 2015;5(MAY).
113. Nonomura N, Takayama H, Nakayama M, Nakai Y, Kawashima A, Mukai M, et al. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU International*. 2011;107(12).

114. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *Journal of Immunological Methods*. 2009;348(1–2).
115. Bostwick DG. *The Pathology of Early Prostate Cancer*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 1989;39(6).
116. Haffner MC, Weier C, Xu MM, Vaghasia A, Gürel B, Gümüşkaya B, et al. Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *Journal of Pathology*. 2016;238(1).
117. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: An early molecular event associated with invasion. *American Journal of Surgical Pathology*. 2007;31(6).
118. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*. 2012;44(6).
119. Herawi M, Kahane H, Cavallo C, Epstein JI. Risk of prostate cancer on first re-biopsy within 1 year following a diagnosis of high grade prostatic intraepithelial neoplasia is related to the number of cores sampled. *Journal of Urology*. 2006;175(1).
120. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Vol. 340, *Science*. 2013.
121. Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong WC, et al. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biology*. 2011;9(9).
122. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. Vol. 147, *Cell*. 2011.
123. Polson ES, Lewis JL, Celik H, Mann VM, Stower MJ, Simms MS, et al. Monoallelic expression of TMPRSS2/ERG in prostate cancer stem cells. *Nature Communications*. 2013;4.

124. Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, et al. An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell*. 2010;17(5).
125. Kunderfranco P, Mello-Grand M, Cangemi R, Pellini S, Mensah A, Albertini V, et al. ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS ONE*. 2010;5(5).
126. Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, Chen CD. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Research*. 2007;17(10).
127. Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, Lewis JL, Collins AT. Prostate Cancer Stem Cells: Do They Have a Basal or Luminal Phenotype? *Hormones and Cancer*. 2011;2(1).
128. Huggins C, Stevens RE, Hodges C v. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *JAMA: Surgery*. 1941;43(2).
129. Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, Esopi DM, Albadine R, Gurel B, et al. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nature Genetics*. 2010;42(8).
130. Mounir Z, Lin F, Lin VG, Korn JM, Yu Y, Valdez R, et al. TMPRSS2:ERG blocks neuroendocrine and luminal cell differentiation to maintain prostate cancer proliferation. *Oncogene*. 2015;34(29).
131. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers H v., Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Research*. 2008;68(13).
132. Robinson D, van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015;161(5).
133. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011.
134. Karanika S, Karantanos T, Li L, Corn PG, Thompson TC. DNA damage response and prostate cancer: Defects, regulation and therapeutic implications. Vol. 34, *Oncogene*. 2015.

135. Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, Zhang X, Smith C, Coleman I, et al. Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nature Communications*. 2014;5.
136. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2012;106(10).
137. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. Vol. 32, *Oncogene*. 2013.
138. Schiewer MJ, Goodwin JF, Han S, Chad Brenner J, Augello MA, Dean JL, et al. Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discovery*. 2012;2(12).
139. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, Jenster GW, Sorensen KD, Tomlins S, et al. The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. Vol. 70, *European Urology*. 2016.
140. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. Vol. 6, *Molecular Oncology*. 2012.
141. Ayub SG, Kaul D, Ayub T. Microdissecting the role of microRNAs in the pathogenesis of prostate cancer. Vol. 208, *Cancer Genetics*. 2015.
142. Endzeliņš E, Melne V, Kalniņa Z, Lietuviētis V, Riekstiņa U, Llorente A, et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: A systematic review. Vol. 15, *Molecular Cancer*. 2016.
143. Filella X, Foj L. MiRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. Vol. 55, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017.
144. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2010;126(5).
145. Cannistraci A, di Pace AL, 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. Vol. 2014, *BioMed Research International*. 2014.

146. Sharova E, Grassi A, Marcer A, Ruggero K, Pinto F, Bassi P, et al. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. *British Journal of Cancer*. 2016;114(12).
147. Nguyen HCN, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GSM, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate*. 2013;73(4).
148. Kojima S, Goto Y, Naya Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. Vol. 62, *Journal of Human Genetics*. 2017.
149. Ruiz-Plazas X, Altuna-Coy A, Alves-Santiago M, Vila-Barja J, García-Fontgivell JF, Martínez-González S, et al. Liquid biopsy-based exo-oncomirnas can predict prostate cancer aggressiveness. *Cancers*. 2021;13(2).
150. Pan X, Hong X, Li S, Meng P, Xiao F. METTL3 promotes adriamycin resistance in MCF-7 breast cancer cells by accelerating pri-microRNA-221-3p maturation in a m6A-dependent manner. *Experimental and Molecular Medicine*. 2021;53(1).
151. Ren D, Yang Q, Dai Y, Guo W, Du H, Song L, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-KB signaling pathway. *Molecular Cancer*. 2017;16(1).
152. Wang L, Song Y, Wang H, Liu K, Shao Z, Shang Z. MiR-210-3p-EphrinA3-PI3K/AKT axis regulates the progression of oral cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(7).
153. Wróblewska JP, Lach MS, Ustaszewski A, Kulcenty K, Ibbs M, Jagiełło I, et al. The potential role of selected miRNA in uveal melanoma primary tumors as early biomarkers of disease progression. *Genes*. 2020;11(3).
154. Lv X, Shen J, Guo Z, Kong L, Zhou G, Ning H. Aberrant expression of mir-592 is associated with prognosis and progression of renal cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*. 2019;12.
155. Ciszkowicz E, Porzycki P, Semik M, Kaznowska E, Tyrka M. Mir-93/mir-375: Diagnostic potential, aggressiveness correlation and common target genes in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16).

156. Fort RS, Mathó C, Oliveira-Rizzo C, Garat B, Sotelo-Silveira JR, Duhagon MA. An integrated view of the role of miR-130b/301b miRNA cluster in prostate cancer. *Experimental Hematology and Oncology*. 2018;7(1).
157. Mu HQ, He YH, Wang SB, Yang S, Wang YJ, Nan CJ, et al. MiR-130b/TNF- α /NF- κ B/VEGFA loop inhibits prostate cancer angiogenesis. *Clinical and Translational Oncology*. 2020;22(1).
158. Rönnau CGH, Verhaegh GW, Luna-Velez M v., Schalken JA. Noncoding RNAs as Novel Biomarkers in Prostate Cancer. Vol. 2014, *BioMed Research International*. 2014.
159. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International Journal of Cancer*. 2011;128(3).
160. Massillo C, Dalton GN, Farré PL, de Luca P, de Siervi A. Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction*. 2017;154(4).
161. Szczyrba J, Nolte E, Wach S, Kremmer E, Stöhr R, Hartmann A, et al. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Molecular Cancer Research*. 2011;9(6).
162. Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Lubovac Z, Andrén O, Olsson B, et al. Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2010;202(2).
163. Das MK, Andreassen R, Haugen TB, Furu K. Identification of endogenous controls for use in miRNA quantification in human cancer cell lines. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2016;13(1).
164. Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2010;42(11).
165. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters LR. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. Vol. 282, *Science*. 1998.

166. Shastry BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. Vol. 52, *Journal of Human Genetics*. 2007.
167. Kassam S, Meyer P, Corfield A, Mikuz G, Sergi C. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): History, biotechnological outlook and practical applications. Vol. 3, *Current Pharmacogenomics*. 2005.
168. Helfand BT, Catalona WJ, Xu J. A genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment. Vol. 25, *Current Opinion in Urology*. 2015.
169. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. Vol. 33, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2015.
170. Salvi S, Conteduca V, Gurioli G, Calistri D, Casadio V, de Giorgi U. Impact of Candidate Genetic Polymorphisms in Prostate Cancer: An Overview. Vol. 20, *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2016.
171. Nakagawa H. Prostate cancer genomics by high-throughput technologies: Genome-wide association study and sequencing analysis. Vol. 20, *Endocrine-Related Cancer*. 2013.
172. Bensen JT, Xu Z, Smith GJ, Mohler JL, Fontham ETH, Taylor JA. Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: A case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate*. 2013;73(1).
173. Aly M, Wiklund F, Xu J, Isaacs WB, Eklund M, D'Amato M, et al. Polygenic risk score improves prostate cancer risk prediction: Results from the Stockholm-1 cohort study. *European Urology*. 2011;60(1).
174. Huang SP, Huang LC, Ting WC, Chen LM, Chang TY, Lu TL, et al. Prognostic significance of prostate cancer susceptibility variants on prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(11).
175. Bao BY, Pao JB, Huang CN, Pu YS, Chang TY, Lan YH, et al. Significant associations of prostate cancer susceptibility variants with survival in patients

- treated with androgen-deprivation therapy. *International Journal of Cancer*. 2012;130(4).
176. Saunders EJ, Kote-jarai Z, Eeles RA. Identification of germline genetic variants that increase prostate cancer risk and influence development of aggressive disease. Vol. 13, *Cancers*. 2021.
 177. Harun-Or-Roshid M, Ali MB, Jesmin, Mollah MNH. Statistical meta-analysis to investigate the association between the Interleukin-6 (IL-6) gene polymorphisms and cancer risk. *PLoS ONE*. 2021;16(3 March).
 178. Yun JW, Yang L, Park HY, Lee CW, Cha H, Shin HT, et al. Dysregulation of cancer genes by recurrent intergenic fusions. *Genome Biology*. 2020;21(1).
 179. Zhang X, Wang D, Liu B, Jin X, Wang X, Pan J, et al. IMP3 accelerates the progression of prostate cancer through inhibiting PTEN expression in a SMURF1-dependent way. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2020;39(1).
 180. Xing S, Tian Z, Zheng W, Yang W, Du N, Gu Y, et al. Hypoxia downregulated miR-4521 suppresses gastric carcinoma progression through regulation of IGF2 and FOXM1. *Molecular Cancer*. 2021;20(1).
 181. McGrath M, Lee IM, Buring J, de Vivo I. Common genetic variation within IGFI, IGFII, IGFBP-1, and IGFBP-3 and endometrial cancer risk. *Gynecologic Oncology*. 2011;120(2).
 182. Pearce CL, Doherty JA, van den Berg DJ, Moysich K, Hsu C, Cushing-Haugen KL, et al. Genetic variation in insulin-like growth factor 2 may play a role in ovarian cancer risk. *Human Molecular Genetics*. 2011;20(11).
 183. Seol HS, Akiyama Y, Lee SE, Shimada S, Jang SJ. Loss of miR-100 and miR-125b results in cancer stem cell properties through IGF2 upregulation in hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
 184. He P, Kang Y, Huang G, Wang H, Xu D, Liao W, et al. miR-141 modulates osteoblastic cell proliferation by regulating the target gene of lncRNA H19 and lncRNA H19-derived miR-675. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(4).

185. Xu X, Yu Y, Zong K, Lv P, Gu Y. Up-regulation of IGF2BP2 by multiple mechanisms in pancreatic cancer promotes cancer proliferation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2019;38(1).
186. Wang C, Li J. A deep learning framework identifies pathogenic noncoding somatic mutations from personal prostate cancer genomes. *Cancer Research*. 2021;80(21).
187. Chen TC, Sakaki T, Yamamoto K, Kittaka A. The roles of cytochrome P450 enzymes in prostate cancer development and treatment. In: *Anticancer Research*. 2012.
188. Holt SK, Kwon EM, Peters U, Ostrander EA, Stanford JL. Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(6).
189. Holt SK, Kwon EM, Koopmeiners JS, Lin DW, Feng Z, Ostrander EA, et al. Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer prognosis. *Prostate*. 2010;70(13).
190. Jou YC, Wang SC, Dia YC, Wang ST, Yu MH, Yang HY, et al. Anti-cancer effects and tumor marker role of glutathione s-transferase mu 5 in human bladder cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6).
191. Zhao C, Zhang W, Zhu X, Xu Y, Yang K, Wei D, et al. TWIST2: A new candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Prostate*. 2019;79(14).
192. Salvi S, Conteduca V, Gurioli G, Calistri D, Casadio V, de Giorgi U. Impact of Candidate Genetic Polymorphisms in Prostate Cancer: An Overview. Vol. 20, *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2016.
193. Schleutker J. Polymorphisms in androgen signaling pathway predisposing to prostate cancer. Vol. 360, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012.
194. Fu C, Dong WQ, Wang A, Qiu G. The influence of ESR1 rs9340799 and ESR2 rs1256049 polymorphisms on prostate cancer risk. *Tumor Biology*. 2014;35(8).
195. Troppmann B, Kleinau G, Krause G, Gromoll J. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Human Reproduction Update*. 2013;19(5).

196. Xiong S, Wang Q, Liu S v., Montgomery RB, Stanczyk FZ, Vallone JG, et al. Effects of luteinizing hormone receptor signaling in prostate cancer cells. *Prostate*. 2015;75(2).
197. Gilep AA, Sushko TA, Usanov SA. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: The role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. Vol. 1814, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2011.
198. Yadav R, Petrunak EM, Estrada DF, Scott EE. Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. Vol. 441, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017.
199. Sushko Tatyana, Gilep A, Usanov S. Genetics, Structure, Function, Mode of Actions and Role in Cancer Development of CYP17. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014;14(1).
200. Sridhar SS, Freedland SJ, Gleave ME, Higano C, Mulders P, Parker C, et al. Castration-resistant prostate cancer: From new pathophysiology to new treatment. Vol. 65, *European Urology*. 2014.
201. Rai R, Sharma KL, Misra S, Kumar A, Mittal B. CYP17 polymorphism (rs743572) is associated with increased risk of gallbladder cancer in tobacco users. *Tumor Biology*. 2014;35(7).
202. Sarma A v., Dunn RL, Lange LA, Ray A, Wang Y, Lange EM, 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*. 2008;68(3).
203. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, Fromont G, Mangin P, Cormier L, et al. Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: The hidden face of estrogens. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(24).
204. Wang Y, Zhang YY, Meng H, Hou X, Li Z, Liu Q, et al. Quantitative Assessment of the Association Between CYP17 rs743572 Polymorphism and Prostate Cancer Risk. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2015;71(2).

205. Poniah P, Mohamed Z, Apalasy YD, Zain SM, Kuppusamy S, Razack AH. Genetic polymorphisms in the androgen metabolism pathway and risk of prostate cancer in low incidence Malaysian ethnic groups. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(10).
206. 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. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013;18(4).
207. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. Vol. 36, *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015.
208. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical biochemist Reviews*. 2016;37(1).
209. Schalken J, Fitzpatrick JM. Enzalutamide: Targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. Vol. 117, *BJU International*. 2016.
210. Li J, Mercer E, Gou X, Lu Y-J. Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes. *American journal of cancer research*. 2013;3(2).
211. 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. *Scientific Reports*. 2017;7.
212. Hayes VM, Severi G, Eggleton SA, Padilla EJD, Southey MC, Sutherland RL, et al. The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2005;14(4).
213. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. Vol. 16, *Reproductive Medicine and Biology*. 2017.

214. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. Vol. 73, Steroids. 2008.
215. Zhao Y, Zheng X, Zhang L, Hu Q, Guo Y, Jiang H, 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. *OncoTargets and Therapy*. 2017;10.
216. 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. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(3).
217. Thellenberg-Karlsson C, Lindström S, Malmer B, Wiklund F, Augustsson-Bälter K, Adami HO, et al. Estrogen receptor β polymorphism is associated with prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(6).
218. Werner E. Meeting report: the future and limits of systems biology. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005.
219. Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post-sequence era. Vol. 33, *Nature Genetics*. 2003.
220. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. Vol. 1A, *Wspolczesna Onkologia*. 2015.
221. Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: From discovery science to personalized medicine. Vol. 17, *Nature Medicine*. 2011.
222. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1).
223. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis, Second Edition*. *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*. 2002;30(3).
224. McLaren W et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. (2016). 2016;
225. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15).

226. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2).
227. Li Z, Li LX, Diao YJ, Wang J, Ye Y, Hao XK. Identification of urinary exosomal mirnas for the non-invasive diagnosis of prostate cancer. *Cancer Management and Research*. 2021;13.
228. Kunz M, Brandl M, Bhattacharya A, Nobereit-Siegel L, Ewe A, Weirauch U, et al. Nanoparticle-complexed antimiRs for inhibiting tumor growth and metastasis in prostate carcinoma and melanoma. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020;18(1).
229. Nan C, Wang Y, Yang S, Chen Y. circCRKL suppresses the progression of prostate cancer cells by regulating the miR-141/KLF5 axis. *Pathology Research and Practice*. 2020;216(11).
230. Bhagirath D, Liston M, Patel N, Akoto T, Lui B, Yang TL, et al. MicroRNA determinants of neuroendocrine differentiation in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*. 2020;39(49).
231. Creighton CJ. Making use of cancer genomic databases. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2018;2018.
232. Boyd LK, Mao X, Lu YJ. The complexity of prostate cancer: Genomic alterations and heterogeneity. Vol. 9, *Nature Reviews Urology*. 2012.
233. Colicchia M, Morlacco A, Cheville JC, Karnes RJ. Genomic tests to guide prostate cancer management following diagnosis. Vol. 17, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2017.
234. Werner H, Sarfstein R, Laron Z. The role of nuclear insulin and igf1 receptors in metabolism and cancer. Vol. 11, *Biomolecules*. 2021.
235. Makimoto G, Ninomiya K, Kubo T, Sunami R, Kato Y, Ichihara E, et al. A novel osimertinib-resistant human lung adenocarcinoma cell line harbouring mutant EGFR and activated IGF1R. *Japanese journal of clinical oncology*. 2021;51(6).
236. Georgiesh T, Namløs HM, Sharma N, Lorenz S, Myklebost O, Bjerkehagen B, et al. Clinical and molecular implications of NAB2-STAT6 fusion variants in solitary fibrous tumour. *Pathology*. 2021;

237. Wang J, Chen L, Qiang P. The role of IGF2BP2, an m6A reader gene, in human metabolic diseases and cancers. Vol. 21, *Cancer Cell International*. 2021.
238. Tsui J, Qi S, Perrino S, Leibovitch M, Brodt P. Identification of a resistance mechanism to igf-ir targeting in human triple negative mda-mb-231 breast cancer cells. *Biomolecules*. 2021;11(4).
239. Kingshott G, Biernacka K, Sewell A, Gwiti P, Barker R, Zielinska H, et al. Alteration of metabolic conditions impacts the regulation of igf-ii/h19 imprinting status in prostate cancer. *Cancers*. 2021;13(4).
240. Qing T, Mohsen H, Marczyk M, Ye Y, O'Meara T, Zhao H, et al. Germline variant burden in cancer genes correlates with age at diagnosis and somatic mutation burden. *Nature Communications*. 2020;11(1).
241. Wang S, Flibotte S, Camunas-Soler J, MacDonald PE, Johnson JD. A New Hypothesis for Type 1 Diabetes Risk: The At-Risk Allele at rs3842753 Associates With Increased Beta-Cell INS Messenger RNA in a Meta-Analysis of Single-Cell RNA-Sequencing Data. *Canadian Journal of Diabetes*. 2021;45(8).
242. Cao Y, Lindström S, Schumacher F, Stevens VL, Albanes D, Berndt SI, et al. Insulin-like growth factor pathway genetic polymorphisms, circulating igf1 and IGFBP3, and prostate cancer survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(5).
243. Borkowetz A, Froehner M, Rauner M, Conrad S, Erdmann K, Mayr T, et al. Neuropilin-2 is an independent prognostic factor for shorter cancer-specific survival in patients with acinar adenocarcinoma of the prostate. *International Journal of Cancer*. 2020;146(9).
244. Förster S, Givehchi M, Nitschke K, Mayr T, Kilian K, Dutta S, et al. Neuropilin-2 and its transcript variants correlate with clinical outcome in bladder cancer. *Genes*. 2021;12(4).
245. Fraga A, Ribeiro R, Coelho A, Vizcaíno JR, Coutinho H, Lopes JM, et al. Genetic polymorphisms in key hypoxia-regulated downstream molecules and phenotypic correlation in prostate cancer. *BMC Urology*. 2017;17(1).

246. Barceló M, Castells M, Bassas L, Vigués F, Larriba S. Semen miRNAs Contained in Exosomes as Non-Invasive Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
247. Hoey C, Ahmed M, Fotouhi Ghiam A, Vesprini D, Huang X, Commisso K, et al. Circulating miRNAs as non-invasive biomarkers to predict aggressive prostate cancer after radical prostatectomy. *Journal of Translational Medicine*. 2019;17(1).
248. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. Vol. 16, *Molecular Cancer*. 2017.
249. de Robertis M, Poeta ML, Signori E, Fazio VM. Current understanding and clinical utility of miRNAs regulation of colon cancer stem cells. Vol. 53, *Seminars in Cancer Biology*. 2018.
250. Hou J, Li XT, Xie KP. Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication. Vol. 20, *Molecular Cancer*. 2021.
251. Labgaa I, Villanueva A, Dormond O, Demartines N, Melloul E. The role of liquid biopsy in hepatocellular carcinoma prognostication. *Cancers*. 2021;13(4).
252. Paiva RM, Zauli DAG, Neto BS, Brum IS. Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. Vol. 22, *Clinical and Translational Oncology*. 2020.
253. Zedan AH, Osther PJS, Assenholt J, Madsen JS, Hansen TF. Circulating miR-141 and miR-375 are associated with treatment outcome in metastatic castration resistant prostate cancer. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
254. Richardsen E, Andersen S, Melbø-Jørgensen C, Rakaee M, Ness N, Al-Saad S, et al. MicroRNA 141 is associated to outcome and aggressive tumor characteristics in prostate cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
255. Ambrozkiwicz F, Karczmariski J, Kulecka M, Paziewska A, Cybulska M, Szymanski M, et al. Challenges in Cancer Biomarker Discovery Exemplified by the Identification of Diagnostic MicroRNAs in Prostate Tissues. *BioMed Research International*. 2020;2020.

256. Dai Y, Ren D, Yang Q, Cui Y, Guo W, Lai Y, et al. The TGF- β signalling negative regulator PICK1 represses prostate cancer metastasis to bone. *British Journal of Cancer*. 2017;117(5).
257. Pudova EA, Krasnov GS, Nyushko KM, Kobelyatskaya AA, Savvateeva M v., Poloznikov AA, et al. MiRNAs expression signature potentially associated with lymphatic dissemination in locally advanced prostate cancer. *BMC Medical Genomics*. 2020;13.
258. Krebs M, Solimando AG, Kalogirou C, Marquardt A, Frank T, Sokolakis I, et al. Mir-221-3p regulates vegfr2 expression in high- risk prostate cancer and represents an escape mechanism from sunitinib in vitro. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(3).
259. Valera VA, Parra-Medina R, Walter BA, Pinto P, Merino MJ. MicroRNA expression profiling in young prostate cancer patients. *Journal of Cancer*. 2020;11(14).
260. Lu M, Ding N, Zhuang S, Li Y. LINC01410/miR-23c/CHD7 functions as a ceRNA network to affect the prognosis of patients with endometrial cancer and strengthen the malignant properties of endometrial cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020;469(1–2).
261. Zhang K, Cai Y, Zhou Q, Sun H, Wei J. Long non-coding RNA SNHG14 impedes viability, migration and invasion of endometrial carcinoma cells through modulating miR-93-5p/ ZBTB7A axis. *Cancer Management and Research*. 2020;12.
262. Jiang Y, Hou J, Zhang X, Xu G, Wang Y, Shen L, et al. Circ-XPO1 upregulates XPO1 expression by sponging multiple miRNAs to facilitate osteosarcoma cell progression. *Experimental and Molecular Pathology*. 2020;117.
263. Zhang L, Wang L, Wang Y, Chen T, Liu R, Yang W, et al. LncRNA KTN1-AS1 promotes tumor growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-23c/ERBB2IP axis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;109.
264. Kalogirou C, Ellinger J, Kristiansen G, Hatzichristodoulou G, Kübler H, Kneitz B, et al. Identification of miR-21-5p and miR-210-3p serum levels as biomarkers for

- patients with papillary renal cell carcinoma: A multicenter analysis. *Translational Andrology and Urology*. 2020;9(3).
265. Pan Z, Miao L. Serum microRNA-592 serves as a novel potential biomarker for early diagnosis of colorectal cancer. *Oncology Letters*. 2020;20(2).
266. Liu W, Liang F, Yang G, Xian L. LncRNA LINC01116 sponges miR-93-5p to promote cell invasion and migration in small cell lung cancer. *BMC Pulmonary Medicine*. 2021;21(1).
267. Du Y, Wei N, Ma R, Jiang S, Song D. A miR-210-3p regulon that controls the Warburg effect by modulating HIF-1 α and p53 activity in triple-negative breast cancer. *Cell Death and Disease*. 2020;11(9).
268. Gao J, Wei J, Wang Y, Li Z, Ma L, Meng X, et al. A versatile magnetic bead-based flow cytometric assay for the detection of thyroid cancer related hsa-miR-221-3p in blood and tissues. *Analyst*. 2021;146(3).
269. Barceló M, Castells M, Pérez-Riba M, Bassas L, Vigués F, Larriba S. Seminal plasma microRNAs improve diagnosis/prognosis of prostate cancer in men with moderately altered prostate-specific antigen. *American Journal of Translational Research*. 2020;12(5).
270. Lee SC, Min HY, Jung HJ, Park KH, Hyun SY, Cho J, et al. Essential role of insulin-like growth factor 2 in resistance to histone deacetylase inhibitors. *Oncogene*. 2016;35(42).
271. Yang Y, Jia B, Zhao X, Wang Y, Ye W. miR-93-5p may be an important oncogene in prostate cancer by bioinformatics analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(6).
272. Shi X, Liu TT, Yu XN, Balakrishnan A, Zhu HR, Guo HY, et al. microRNA-93-5p promotes hepatocellular carcinoma progression via a microRNA-93-5p/MAP3K2/c-Jun positive feedback circuit. *Oncogene*. 2020;39(35).
273. Shen E, Wang X, Liu X, Lv M, Zhang L, Zhu G, et al. MicroRNA-93-5p promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by repressing tumor suppressor AHNAK expression. *Cancer Cell International*. 2020;20(1).

274. Yang K, Li YW, Gao ZY, Xiao W, Li TQ, Song W, et al. MiR-93 functions as a tumor promoter in prostate cancer by targeting disabled homolog 2 (DAB2) and an antitumor polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*) on their expression. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125.
275. Wang C, Tian S, Zhang D, Deng J, Cai H, Shi C, et al. Increased expression of microRNA-93 correlates with progression and prognosis of prostate cancer. *Medicine*. 2020;99(22).
276. Sharma S, Pei X, Xing F, Wu SY, Wu K, Tyagi A, et al. Regucalcin promotes dormancy of prostate cancer. *Oncogene*. 2021;40(5).
277. Tuncay S, Banerjee S. MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2011;(10).
278. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016;2016.
279. Fischer S, Tahoun M, Klaan B, Thierfelder KM, Weber MA, Krause BJ, et al. A radiogenomic approach for decoding molecular mechanisms underlying tumor progression in prostate cancer. *Cancers*. 2019;11(9).
280. Basu S, Chaudhary A, Chowdhury P, Karmakar D, Basu K, Karmakar D, et al. Evaluating the role of hsa-miR-200c in reversing the epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Gene*. 2020;730.
281. Xia L, Han Q, Chi C, Zhu Y, Pan J, Dong B, et al. Transcriptional regulation of PRKAR2B by miR-200b-3p/200c-3p and XBP1 in human prostate cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020;124.