

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Programa: Patología de los tumores humanos (285B)

**IMPLICACIONES CLÍNICOPATOLOGICAS  
DEL GEN *TMPRSS2-ERG* Y PERFIL  
MOLECULAR ASOCIADO EN CÁNCER DE  
PRÓSTATA.**

**Tesis Doctoral**

Presentada por  
Antonio Fernández Serra

Dirigida por  
Dr. José Antonio López Guerrero  
Dr. José Rubio Briones  
Dra. Rosario Gil Bensó

Valencia

2013



**D. José Antonio López Guerrero**, Jefe Clínico del Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

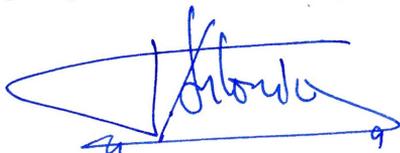
**D. José Rubio Briones**, Jefe Clínico del Servicio de Urología de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología

**D.ª Rosario Gil Bensó**, Catedrática del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICAN QUE

La presente tesis doctoral “Implicaciones clínicopatológicas del gen *TMPRSS2-ERG* y perfil molecular asociado en cáncer de próstata” ha sido realizada por Antonio Fernández Serra en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, 14 Enero de 2013.



Fdo: D. José Antonio López Guerrero



Fdo: D. José Rubio Briones



Fdo: D.ª Rosario Gil Bensó



La presente tesis doctoral se ha financiado con las ayudas FIS PI061169 y PI101206 concedidas por el Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ACOMP/2009/176 (Generalitat Valenciana) y Astra Zeneca (Madrid).



*¡Dios te proteja, viejo Marinero,  
de los demonios que tanto te atormentan!  
Pero, ¿por qué me miras así? Dime.  
Porque...al Albatros maté con mi ballesta.*

*S.T. Coleridge- La Balada del viejo Marinero*



*Para mi padre*  
*A mi madre*  
*A Ana*



## AGRADECIMIENTOS

Sin la colaboración de muchas personas este trabajo hubiera sido inviable, así pues, querría agradecer en primer lugar a los Dres. D. Antonio y D. Manuel Llombart Bosch así como al Dr. D. Manuel Llombart Fuertes y a la Dra. Asunción Perales por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

Al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia, en especial a Rosario por su dirección, sus enseñanzas sobre FISH, disposición de ayudar y simpatía. También a Laura Martínez por su ayuda técnica y a Rafa y Teresa por su ayuda con el FISH.

Al Servicio de Anatomía Patológica de la FIVO y en especial al Dr. Sergio Almenar por su inestimable ayuda y Ana Calatrava por su indudable profesionalidad y capacidad de trabajo.

Al Servicio de Urología de la FIVO especialmente al Dr. Eduardo Solsona por su apoyo en todos los momentos del desarrollo de este proyecto y a Pepe Rubio por su dirección y enseñanza de los aspectos clínicos del cáncer de próstata.

A los laboratorios que me ayudaron en la realización de técnicas; Al Dr José Cervera y todo el personal del laboratorio de Citogenética del servicio de Hematología del Hospital La Fe por su ayuda en el cultivo de células. Al Dr. Pascual Bolufer y a todo el personal del laboratorio de Biología Molecular del hospital La Fe por su ayuda con la clonación

Al Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular del Hospital del Mar de Barcelona debo agradecerles la obtención de las excelentes sondas no comerciales de FISH.

A mis compañeros de laboratorio; Zaida por todo lo que me enseñó de Biología Molecular entre otras cosas. Hemos pasado muchas cosas juntos, viste el principio y por fin parece que verás el final. A Luis, de ti no sólo aprendí FISH, sino muchas otras cosas, algunas de ciencia y otras no, de todo he tomado buena nota. A Tania por su gran capacidad de trabajo, dedicación y por estar siempre dispuesta a ayudarme: A Trizia por su afán de aprender, simpatía y amabilidad. Y en general a todo el laboratorio.

A José Antonio tengo que agradecerle muchas cosas, por un lado su profesionalidad, conocimientos, rigurosidad y meticulosidad, y por otro lado su apoyo y buena dirección. Muchas gracias.

A mi familia, especialmente a mis padres, que siempre nos dieron su apoyo incondicional, sin vosotros no estaría aquí. Se que estais orgullosos. Y a la besonada, no puedo creer que esta tesis sea mayor que vosotros.

Ana, desgraciadamente mi elocuencia ni de lejos podría empezar a expresar todo lo que me has ayudado, apoyado e inspirado. Así que simplemente te diré que por increíbles caminos e innumerables fatigas me he abierto camino hacia el castillo, más allá de la ciudad de los goblins. Muchas gracias, sabes que sin ti no habría salido de *inside the labyrinth*.

Me temo que me dejo algunas personas, así que, parafraseando a Neil Gaiman; ""Por los amigos ausentes, los amores perdidos, los viejos dioses y la estacion de nieblas; y que cada uno de nosotros de al diablo su merecido"

Gracias, muchas gracias a todos, espero que esta tesis este a la altura de vuestra ayuda.

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1- EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. ....	3
1.1.1.- Epidemiología y características clínicas del cáncer de próstata. ....	3
1.1.2.- Anatomía y función de la glándula prostática.....	4
1.1.3.- Diagnóstico del cáncer de próstata. ....	5
1.1.4.- Estadificación TNM. ....	9
1.2- OPCIONES TERAPÉUTICAS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	12
1.2.1.- Tratamiento primario. ....	12
1.2.2.- Terapia hormonal. ....	13
1.2.3.- Seguimiento de pacientes con CaP. ....	13
1.2.4.- Tratamiento del CaP resistente a la castración. ....	13
1.3- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. ....	14
1.3.1.- Alteraciones citogenéticas. ....	14
1.3.2.- Alteraciones somáticas a nivel de ADN.....	14
1.3.3.- Alteraciones a nivel de ARN. ....	15
1.3.4.- Alteraciones a nivel de micro ARN (miARN).....	15
1.3.5.- Alteraciones a nivel del receptor androgénico.....	16
1.3.6.- Alteraciones de la interacción estroma epitelio.....	17
1.3.7.- Alteraciones en la adhesividad celular. ....	17
1.3.8.- Inflamación en CaP.....	17

1.4- COMPONENTE HEREDITARIO DEL CAP. ....	19
1.5.- NUEVOS BIOMARCADORES MOLECULARES EN EL MANEJO CLÍNICO DEL CAP. ....	20
1.5.1.- EPCA. ....	20
1.5.2.- <i>GSTP-1</i> . ....	20
1.5.3.- <i>AMACR</i> . ....	21
1.5.4.- <i>PAR-1</i> y <i>PAR-2</i> . ....	21
1.5.5.- <i>HEPSIN</i> . ....	21
1.5.6.- <i>Pim-1</i> . ....	21
1.5.7.- <i>SPINK-1</i> . ....	22
1.5.8.- <i>TPD52</i> . ....	22
1.5.9.- <i>PTEN</i> . ....	22
1.5.10.- <i>PCA3<sup>DD3</sup></i> . ....	24
1.6.- GENES DE FUSIÓN Y CÁNCER DE PRÓSTATA. ....	26
1.7.- IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	29
1.7.1.- Características biológicas de <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	29
1.7.2.- Génesis de <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	34
1.7.3.- Rutas biológicas relacionadas con <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	34
1.8.- SIGNIFICADO CLÍNICO DE <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	37
1.8.1.- Implicaciones diagnósticas y pronósticas. ....	37
1.8.2.- <i>TMPRSS2-ERG</i> como diana terapéutica. ....	39
1.10.- CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES. ....	40
1.10.1- Enfermedad mínima residual. ....	40

1.10.2- Transición epitelial mesenquimal, transición mesenquimal epitelial y capacidad angiogénica de las células tumorales.....	40
1.10.3- Detección y cuantificación de células tumorales circulantes.....	42
1.10.4- Aplicación traslacional de la cuantificación de células tumorales circulantes en cáncer de próstata.....	56
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
2.1.- HIPÓTESIS.....	59
2.2.- OBJETIVOS.....	60
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
3.1. PACIENTES.....	63
3.2- PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS ESTUDIADOS.....	66
3.3. REVISIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS.....	67
3.4. AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN FORMOL E INCLUIDAS EN PARAFINA.....	67
3.4.1.- Cuantificación de la concentración de ARN mediante espectrofotometría .....	70
3.4.2.- Testado de la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	70
3.5. AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS OBTENIDAS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	71
3.5.1.- Obtención de la fracción de células mononucleadas en sangre periférica.....	71
3.5.2.- Extracción de ARN a partir de la fracción de células mononucleadas de sangre periférica.....	72
3.6. CULTIVO CELULAR.....	75
3.6.1. Crioconservación de células cultivadas.....	77
3.7. TRANSCRIPCIÓN INVERSA.....	77

3.8. PCR CUALITATIVA. ....	79
3.8.1. Purificación de los productos de PCR. ....	82
3.9.- SECUENCIACIÓN. ....	83
3.10. PCR CUANTITATIVA. ....	85
3.10.1. Cuantificación relativa por RT-PCR cuantitativa. ....	87
3.10.3. Método de análisis de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . ....	90
3.10.2. Cuantificación absoluta de transcritos <i>TMPRSS2-ERG</i> en muestras de sangre periférica. ....	91
3.11. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR. ....	99
3.11. CONSTRUCCIÓN DE MATRICES TISULARES. ....	107
3.12- INMUNOHISTOQUÍMICA. ....	109
3.12.1.- Evaluación histopatológica. ....	111
3.13 HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH). ....	112
3.13.3 Interpretación de señales. ....	116
3.15- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS. ....	120
3.15.1- Estadística descriptiva. ....	120
3.15.2- Estadística analítica. ....	120
3.16- ANÁLISIS SERIE RETROSPECTIVA Y PROSPECTIVA. ....	121
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>123</b>
4.1- SERIE RETROSPECTIVA. ....	125
4.1.1- Estadística descriptiva. ....	125
4.1.2- Determinación de <i>TMPRSS2-ERG</i> por RT-PCR. ....	127
4.1.3- Estudio de <i>TMPRSS2-ERG</i> por Hibridación In Situ Fluorescente (FISH). ....	129

4.1.4.- Comparación entre las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) y RT-PCR.....	133
4.1.5.- Análisis de la expresión génica. ....	137
4.1.6.- Análisis de la expresión proteica.....	167
4.1.7.- Patrón de la expresión génica.....	182
4.1.8.- Análisis de supervivencia. ....	188
4.1.8.- Análisis diferencial de Progresión. ....	207
4.2- SERIE PROSPECTIVA. ....	214
4.2.1- Estadística descriptiva.....	214
4.2.2- Estudio de <i>TMPRSS2-ERG</i> por Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) y RT-PCR.....	216
4.2.5.- Caracterización de <i>TMPRSS2-ERG</i> en Células Tumorales Circulantes (CTC).....	218
<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>225</b>
5.1.- SIGNIFICADO CLÍNICOBIOLÓGICO DEL GEN DE FUSIÓN <i>TMPRSS2-ERG</i> EN CAP. ....	227
5.1.1. Frecuencia del gen de fusión <i>TMPRSS2-ERG</i> . ....	228
5.1.2. Gen de fusión <i>TMPRSS2-ERG</i> y asociación clinicopatológica.....	232
5.1.3. Otros biomarcadores de progresión en CaP y asociación clinicopatológica. ....	233
5.2.- UTILIDAD DIAGNÓSTICA DEL GEN DE FUSIÓN <i>TMPRSS2-ERG</i> EN LA DETECCIÓN DE CTC EN CAP. ....	244
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>249</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>253</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>301</b>
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS: .....	303



# GLOSARIO



**Aa:** aminoácido.

**ABC:** avidina-biotina-complex.

**ABI:** applied biosystems instrument

**Ac:** anticuerpo.

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario.

**Ag:** antígeno.

**AR:** receptor de andrógenos (*androgen receptor*).

**ARE:** elemento de respuesta a andrógenos (*androgen responsiveness element*).

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**ASCO:** asociación americana de oncología clínica (*American Association of Clinical Oncology*).

**ASK-1:** quinasa reguladora de señal de apoptosis (*apoptosis-signal-regulating kinase 1*).

**CaP:** cáncer de próstata.

**Cav-1:** caveolina 1.

**CCR:** cáncer colorrectal.

**CEA:** antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*).

**CGH:** hibridación genómica comparada (*comparative genome hybridation*).

**CK:** citoqueratina.

**COPA:** análisis por perfil de outliers en cáncer (*cancer outlier profile analysis*).

**CNV:** variación de número de copias (*copy number variation*).

**CPRC:** cáncer de próstata resistente a castración.

**CTC:** células tumorales circulantes.

**CTD:** células tumorales diseminadas.

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro.

**DAPI:** 4'6' Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

**DEPC:** dietilpirocarbonatada

**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato.

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*).

**EMR:** enfermedad mínima residual.

**EMT:** transición epitelio mesenquimal (*epithelial mesenchymal transition*).

**EpCAM:** molécula de adhesión de células epiteliales.

**ERD:** examen rectal digital.

**ETS:** familia de factores de transcripción E26 (*E Twentysix*).

**ETS:** enfermedad de transmisión sexual.

**ERG:** gen relacionado con ETS (*ETS related gene*).

**ETV1:** variante de translocación ETS 1 (*ETS translocation variant 1*)

**FDA:** administración de alimentos y fármacos (*food and drug administration*).

**FIVO:** fundación instituto valenciano de oncología.

**FISH:** hibridación in situ fluorescente (*fluorescence in situ hybridation*).

**FRET:** transferencia electrónica de la resonancia.

**GSTP-1:** glutatión-S-transferasa pi.

**GWAS:** estudios de asociación de todo el genoma (*genome wide association study*).

**HIF $\alpha$ :** factor inducible de hipoxia  $\alpha$ .

**HBP:** hiperplasia prostática benigna.

**HPC1:** gen del cáncer hereditario 1 (*hereditary prostate cancer gene 1*).

**HSP:** proteínas de shock por calor (*heat shock proteins*)

**ICQ:** inmunocitoquímico.

**IGF:** factor de crecimiento de insulina (*insuline growth factor*).

**Ig G:** inmunoglobulina G.

**IHQ:** inmunohistoquímica.

**IL-6:** interleucina 6.

**ILP:** intervalo libre de progresión.

**ILPB:** intervalo libre de progresión bioquímica.

**ISSET:** separación de células tumorales epiteliales por tamaño.

**mAb:** anticuerpo monoclonal (*monoclonal antibody*).

**MAD:** Desviación absoluta de la mediana (*median absolute deviation*).

**Mb:** megabases.

**miARN:** micro ARN.

**MUC1:** mucina 1.

**PAP:** fosfatasa ácida prostática.

**PAR-1,2:** receptores activados por proteasas. 1 y 2.

**PCP:** parámetros clinicopatológicos.

**PIN:** neoplasia intraepitelial prostática (*prostatic intraepithelial neoplasia*).

**PIA:** atrofia proliferativa inflamatoria (*prostatic inflammatory atrophy*).

**PSA:** antígeno prostático específico (*prostatic specific antigen*).

**PTR:** prostatetomía radical.

**PTEN:** homólogo de la fosfatasa y la tensina (*Phosphatase and tensin homolog*).

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real.

**RLM-RACE:** amplificación rápida de extremos de ADNc.

**RT:** Retrotranscripción.

**SC:** síndrome de Cowden.

**SDS:** dodecil sulfato sódico.

**SF:** suero fisiológico.

**SG:** supervivencia global.

**SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*).

**SP:** sangre periférica.

**SPINK-1:** Inhibidor serina peptidasa Kazal tipo 1.

**TGF:** factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor*).

**TI:** transcripción inversa.

**TMPRSS2:** receptor transmembrana con actividad serín proteasa 2.

**VA:** vigilancia activa.

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial.

**VPP:** valor predictivo positivo.

**VPN:** valor predictivo negativo.



# 1- INTRODUCCIÓN



## **1.1- EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.**

### **1.1.1.- Epidemiología y características clínicas del cáncer de próstata.**

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de tumor más frecuente en hombres después del cáncer de pulmón. Mundialmente se diagnostican alrededor 700.000 nuevos casos al año (11,7% del total de tumores en hombres). Aunque en los países en vías de desarrollo es el sexto tumor en incidencia, en los países desarrollados es mucho más frecuente, tanto es así, que en Norteamérica, Europa del Norte y Australia es el tumor más incidente. En el ámbito de la Unión Europea, el CaP es causante directo de la muerte del 3% de los varones y representa el 10% de las muertes por causas oncológicas, de modo que el CaP representa un problema sanitario de primer orden (1).

En España se diagnostican unos 13.300 nuevos casos al año (13,6% de los tumores entre varones de nuestro país), siendo la supervivencia a los cinco años en torno al 65% con una edad media de fallecimiento de 75 años (2). Los datos referidos a la Comunidad Valenciana indican que en el año 2005 se diagnosticaron 1436 casos de CaP, siendo la tasa bruta de incidencia del 61,6 casos por cada 10000 habitantes. En el año 2008 la tasa ajustada de mortalidad resultó del 23,86 por cien mil habitantes en la provincia de Valencia y 20,43 y 27,56 en las provincias de Alicante y Castellón respectivamente estando en una posición intermedia entre las comunidades autónomas. La tasa global española para ese mismo año se sitúa en el 21,48 (3).

Hay que reseñar que la incidencia del CaP ha aumentado en los últimos años, principalmente por dos motivos. En primer lugar, debido al aumento significativo de la esperanza de vida de la población dado que esta neoplasia está ligada a la edad de manera clara, tal como evidencia el hecho de que tres cuartas partes de enfermos a nivel mundial son mayores de 65 años (4). En segundo lugar, por la introducción, a finales de los 80, de la determinación de los niveles séricos de antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) en el cribado del CaP, hecho este último que aumentó drásticamente los casos diagnosticados en fase preclínica (3).

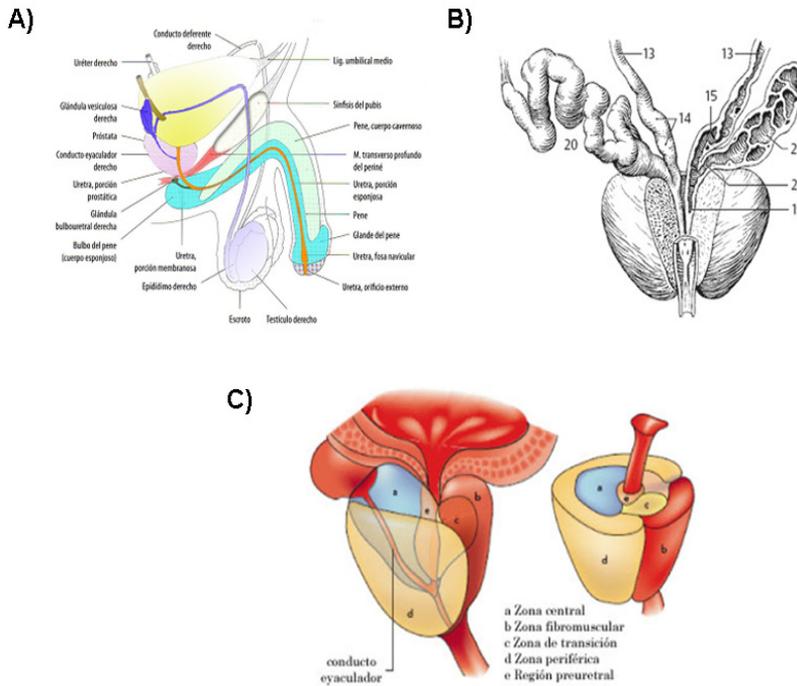
### 1.1.2.- Anatomía y función de la glándula prostática.

La próstata es la glándula responsable de la secreción alcalina necesaria para la supervivencia de los espermatozoides en el pH ácido vaginal. Tiene forma de cono aplanado invertido con la base en la parte superior y el vértice en la inferior (fig. 1c). Se sitúa por detrás y debajo de la vejiga, alrededor del cuello vesical y de la uretra prostática, apoyada sobre el suelo del periné. Está encerrada en la celda prostática, limitada por desdoblamientos aponeuróticos (fig. 1a) (5).

En la próstata se diferencian las siguientes partes: la *base* es la porción superior de la glándula que está en contacto con la vejiga; el *vértice* es la porción inferior, orientada hacia delante y abajo; la *cara anterior* se encuentra orientada hacia la sínfisis del pubis, mientras que la cara posterior lo hace hacia el recto y la ínfimo lateral, hacia los lados de la celda y hacia abajo (5).

Estructuralmente, la próstata está conformada por un parénquima constituido por 30-50 pequeñas glándulas que desembocan en la uretra a través de conductillos. Externamente la próstata está rodeada por una cápsula que emite tabiques fibrosos hacia el interior y de un sistema músculo elástico muy desarrollado. La secreción está almacenada en las cavidades glandulares, pudiendo calcificarse. Según su origen, se diferencia una parte endodérmica, que forma dos lóbulos laterales y un lóbulo medio y otra parte mesodérmica que forma el utrículo prostático, un resto atrófico derivado del conducto paramesonéfrico (o de Müller).

La mayoría de los tumores se forman en la zona periférica de la próstata, donde son detectables mediante un examen rectal digital (ERD). Raramente se dan en la zona transicional y son muy raros los casos que se localizan en la zona central (Figura 1).



**Figura 1:** Anatomía y esquema de la glándula prostática, tomado de A) (6); B) (7); C) (8)

### 1.1.3.- Diagnóstico del cáncer de próstata.

El CaP es una enfermedad compleja, asociada a múltiples factores que afectan a su presentación, progresión y pronóstico (9). A nivel histológico, el CaP está constituido por una mezcla heterogénea de células, en la que las epiteliales y estromales juegan un papel crucial en la tumorigénesis (10). Este proceso parece estar asociado tempranamente con una displasia que comienza como atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), progresa a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y en algunos casos desemboca en un adenocarcinoma. Existen evidencias que apuntan a que uno de los desencadenantes de la tumorigénesis podría ser una inflamación de la próstata debida a agentes infecciosos o bien por ingesta de carcinógenos (11). Paralelamente, y en el curso de la evolución de lesiones premalignas, algunas células acumulan alteraciones génicas que, junto con la señalización andrógena, estimulan el crecimiento y proliferación del tumor (11). Con respecto a la anatomía patológica, más del 95% de los casos son

adenocarcinomas mientras que el resto se compone de carcinomas de células escamosas o transicionales y sarcomas (3).

El diagnóstico de la enfermedad se fundamenta en la determinación de los niveles séricos de PSA, el examen rectal digital (ERD) y la ecografía (12) que en conjunto ayudan a decidir la realización de una biopsia transrectal, la prueba definitiva en el diagnóstico de la enfermedad. El CaP se infraestadía en un 40-60% de los pacientes, para paliar este efecto se han usado aproximaciones como regresiones logística y redes neuronales para mejorar el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad (13, 14).

### 1.1.3.1- PSA y pruebas derivadas.

Los niveles séricos PSA aportan información altamente órgano-específica, pero poco específica de CaP. Así, tanto en hiperplasia prostática benigna (HBP por sus siglas en inglés) como en prostatitis se producen aumentos séricos de este biomarcador (15), pero no sólo eso, sino que además, muchos pacientes con CaP localizado presentan valores de PSA que se solapan con los de sujetos sanos, resultando una zona gris de difícil interpretación el intervalo entre 4 y 10 ng/ml, especialmente en pacientes jóvenes (16)(17). A fin de potenciar el poder diagnóstico de esta prueba se usan otras derivadas, especialmente útiles en dicha zona gris, dado que en este rango de concentraciones se realizan en la actualidad gran número de biopsias prostáticas innecesarias (18)

Estas pruebas diagnósticas derivadas del PSA son:

**a) Densidad del PSA.** Consiste en un cociente entre los niveles de PSA sérico y el volumen prostático medido por ecografía transrectal. La ventaja de esta prueba es que, en teoría permite discriminar entre CaP y HBP, ya que el tumor prostático excreta mayor cantidad de PSA por  $\text{cm}^3$ . Su principal inconveniente radica en que la eficacia de esta prueba depende mucho de la medida exacta del volumen prostático y por otro lado de la proporción entre estroma y epitelio en HBP, ya que sólo el segundo tipo celular sintetiza PSA (19). Sin embargo existe mucha controversia en cuanto al punto de corte a usar. Seaman y cols. defienden que en casos con un PSA sérico entre 4 y 10 ng/ml y un ERD normal, una densidad de  $\text{PSA} \geq 0,15 \text{ ng/ml/cm}^3$  indica probabilidad aumentada de CaP (20). Sin embargo, este valor no se ha establecido en su uso clínico porque otros trabajos no han hallado diferencias significativas entre los casos estratificados según este punto de corte (21, 22). Una estrategia adoptada para paliar estos defectos es usar el volumen de la zona periférica de la próstata en la fórmula, dado que en esta zona es en la que se dan los tumores a diferencia de las hiperplasias benignas (23).

**b) La velocidad del PSA.** Mide el aumento de concentración de PSA total con relación a un tiempo dado, teóricamente mayor en el CaP que en la HBP, dado

que el epitelio prostático crece más rápido en CaP que en HBP (24). Se ha propuesto un punto de corte de esta prueba de  $\geq 0,75 \text{ ng/ml/año}$  (25). Su fórmula es:

$$\frac{\left( \left[ \frac{PSA2 - PSA1}{tiempo1(años)} \right] + \left[ \frac{PSA3 - PSA2}{tiempo2(años)} \right] \right)}{2}$$

Siendo PSA1, PSA2 y PSA3 medidas de los valores séricos de PSA efectuadas en un período de dos años. Esta prueba también tiene un gran problema; es difícil de realizar y estandarizar por el gran número de tests distintos empleados. Así pues esta prueba es más útil en el seguimiento que en el diagnóstico precoz del CaP.

**c) Formas moleculares de PSA.** En suero o plasma encontramos el PSA bien libre o bien acompañado covalentemente con proteínas inhibitoras como la  $\alpha 1$ -antiquimotripsina que forma el complejo: PSA- $\alpha 1$ ACT, y la  $\alpha 2$ -macroglobulina ( $\alpha 2$ M), que forma PSA:  $\alpha 2$ M (26, 27). El primer complejo no tiene actividad enzimática mientras que el segundo se activa frente a pequeños sustratos. El hecho de que el PSA libre es el 5-10% del total circulante da una idea de la importancia de estas formas moleculares (28). Los inmunoensayos comerciales determinan la concentración de PSA total (útil en la discriminación entre CaP e HBP), de complejo PSA:  $\alpha 1$ ACT y de PSA libre. No así el PSA unido a la  $\alpha 2$ M, inmunológicamente indetectable debido a que la proteína rodea completamente a la molécula de PSA bloqueando todos sus epitopos (26).

**d) Pro-PSA:** se trata de uno de los zimógenos del PSA compuesto por 244 aminoácidos (aas) y una pieza aminoterminal de 7 o de 2 aas. Esta proteína está diferencialmente expresada en la zona periférica del tumor prostático con respecto a la zona de transición benigna. También es remarcable que este pro-enzima se expresa específicamente en el suero de pacientes con CaP confirmado. (29, 30)

Pese a que la detección de PSA es la prueba diagnóstica de análisis más utilizada, numerosos estudios sugieren que el CaP está sobrediagnosticado en un 30-50% de los casos. Es decir, no todos los pacientes con PSA elevado tienen un tumor prostático. De hecho, en la rama europea del estudio de cribado poblacional publicado en 2010 con un seguimiento de 12 años se observa una disminución del riesgo relativo de muerte por CaP en el grupo de *screening* frente al grupo control de 0,4%, necesitando tratar sólo 12 hombres diagnosticados para salvar a uno de morir por CaP. (31) Sigue siendo patente que dichos estudios de cribado llevan a un considerable sobrediagnóstico de la enfermedad (32). Por otro lado tanto el estudio americano, *Prostate Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Screening Trial* como el europeo coinciden en el escaso valor del *screening* de esta enfermedad (32, 33) por lo que pruebas más específicas se hacen necesarias.

### **1.1.3.2- Examen rectal digital.**

El ERD es la prueba usada actualmente en el diagnóstico del CaP junto con los niveles séricos de PSA. El ERD es positivo si encuentra nódulos o induración que son procesos tardíos en el CaP, por tanto, su uso único o principal en la detección precoz del CaP es muy cuestionable. El valor predictivo positivo del ERD es del 35% similar al de los niveles séricos de PSA y la ecografía. (34)

Actualmente se integran estos factores en nomogramas diagnósticos para suplir las deficiencias de cada técnica en cuanto a la especificidad y sensibilidad (35).

### **1.1.3.3- Ecografía prostática.**

La ecografía resulta más sensible que específica en el diagnóstico del CaP. Existe un gran solapamiento en la imagen ecográfica ofrecida por la hipertrofia prostática benigna, enfermedad inflamatoria, infarto, cirugía o biopsias previas que son situaciones que pueden mimetizar al CaP por lo que la especificidad de esta técnica es muy baja, en torno al 30%.

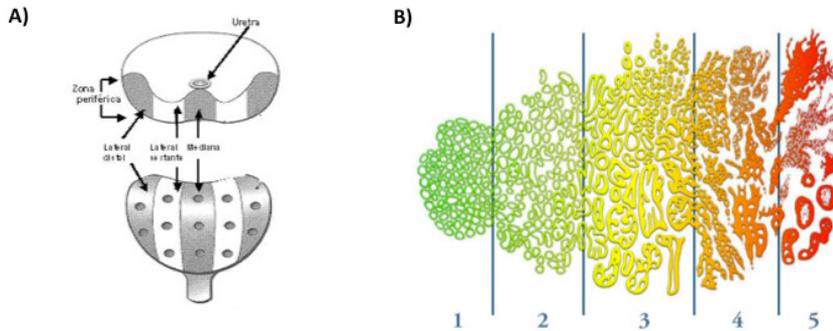
En cuanto a su sensibilidad se publican cifras muy variables debido a la subjetividad inherente a cualquier prueba ecográfica, por lo que esta técnica se recomienda para guiar la biopsia prostática pero no en la detección precoz del CaP (36).

### **1.1.3.4.- Diagnóstico anatomopatológico del Cáncer de Próstata.**

El estándar en el diagnóstico del CaP es la valoración anatomopatológica del tejido prostático obtenido mediante biopsia ecoguiada, que suele ser transrectal aunque más raramente se puede acceder a la glándula prostática a través del periné. La biopsia por sextantes ya no está considerada como suficientemente informativa (fig.2). Actualmente se prefieren muestras de 10 a 12 cilindros. Un número mayor de estos no aporta información más concluyente y alimenta el sobrediagnóstico (37, 38). De hecho, en un estudio inglés se considera que la obtención de 10 cilindros con *trucut* trocar es lo ideal (39).

Una vez diagnosticado el CaP, el principal factor pronóstico lo constituye el grado de Gleason que consiste en asignar un grado del 1 al 5, de mayor a menor diferenciación tisular, a cada uno de los dos focos principales del tumor, teniendo en cuenta que cada foco debe ocupar al menos el 5% de la superficie del tumor. A no ser que el foco tenga un *score* de 4 ó 5, en cuyo caso debe considerarse en el cómputo aunque tenga una superficie menor (Figura 2). La suma de ambos valores permite establecer el *score*. Aunque este parámetro constituye el *gold standard* en

el manejo clínico del CaP presenta el inconveniente de la subjetividad interobservador y la variabilidad interpretativa en el tiempo (40). También ha generado controversia la no inclusión del foco terciario del tumor en la determinación de este estadio (41).



**Figura 2:** Estadificación anatomopatológica del CaP. A) esquema de una biopsia prostática realizada por el método sextante. Figura tomada de <http://goo.gl/gRr2c>. B) esquema morfológico del tejido tumoral prostático según su grado de Gleason. Tomado de [stjohnprovidence.org](http://stjohnprovidence.org)

Son factores pronósticos dentro de la biopsia, tanto el número de cilindros positivos obtenidos como el porcentaje de tejido tumoral en cada uno de ellos. En un trabajo de un grupo español con una media de 6,13 cilindros, el pronóstico era mejor en los casos con menos de 2 cilindros afectados que en los casos con 2 a 4 cilindros, y estos a su vez mostraron un mejor pronóstico que los casos con más de 5 cilindros tumorales (42).

En el pronóstico de la enfermedad, hay otro gran problema: la carencia de un método fiable que permita determinar el momento en que el tumor prostático se convertirá en resistente a la castración. A partir de este punto, el pronóstico del paciente empeora drásticamente y es frecuente que se produzcan metástasis óseas, para las que actualmente sólo se dispone de tratamiento paliativo (43).

### 1.1.4.- Estadificación TNM.

La clasificación TNM (tumor, adenopatías y metástasis) es la más extensamente usada en el estadiaje del CaP y está muy relacionada con el pronóstico de estos tumores (38). (Tabla 1).

## INTRODUCCIÓN

---

**Tabla 1:** Clasificación TNM del CaP del American Joint Committee on Cancer (AJCC) cuya última actualización data de 2010.

T: Tumor primario (\*).

---

<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor primario.	
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario.	
<b>T1</b> Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.	<b>T1a</b>	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado.
	<b>T1b</b>	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor del 5% del tejido resecado.
	<b>T1c</b>	Tumor identificado mediante biopsia prostática.
<b>T2</b> Tumor confinado en la próstata	<b>T2a</b>	El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos.
	<b>T2b</b>	El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo pero no ambos lóbulos.
	<b>T2c</b>	El tumor abarca ambos lóbulos.
<b>T3</b> Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática.	<b>T3a</b>	Extensión extracapsular unilateral o bilateral.
	<b>T3b</b>	Tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es.
<b>T4</b>	Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales (cuello vesical, esfínter externo, recto, músculo elevador del ano y/o pared pélvica).	

---

(\*). Solamente se aplica para Adenocarcinoma prostático.

N: Ganglios linfáticos regionales (\*).

---

<b>Nx</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
<b>N0</b>	No se demuestran metástasis ganglionares regionales.
<b>N1</b>	Metástasis en ganglios linfáticos regionales.

---

(\*) Los ganglios linfáticos regionales son los ganglios de la pelvis menor

M: Metástasis a distancia.

---

<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia.
<b>M1</b>	<b>M1a</b> Ganglios linfáticos no regionales.
	<b>M1b</b> Huesos.
	<b>M1c</b> Otras localizaciones.

---

Clínicamente podemos distinguir dos grandes grupos de CaP: unos son tumores prostáticos capaces de diseminarse que acabarán siendo letales mientras que otros son relativamente indolentes (11). Este hecho plantea de entrada una serie de retos: cómo distinguir unos tumores de otros y el modo de abordaje clínico óptimo en cada caso. Para conseguir esto necesitamos mejores herramientas pronósticas y diagnósticas.

### 1.2- OPCIONES TERAPÉUTICAS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA.

#### 1.2.1.- Tratamiento primario.

En el tratamiento primario del CaP existen varias opciones disponibles. En primer lugar, existe la posibilidad de la *vigilancia activa*, consistente en un estrecho seguimiento del paciente, de modo que se difiere el tratamiento hasta que éste sea necesario. Obviamente, esta estrategia puede aplicarse en aquellos casos con bajo riesgo de progresión (44, 45), dado que un CaP bien diferenciado tiene una supervivencia a los 20 años del 80-90%.

El abordaje quirúrgico es el más frecuente en la actualidad. La *prostatectomía radical* (PTR) es la cirugía realizada con intención de extirpar y curar completamente el CaP. Generalmente, se realiza en pacientes menores de 70 años, según su esperanza de vida y comorbilidades. La intervención puede ser retropúbica (abierta o laparoscópica) o perineal, según la vía de acceso a la glándula prostática. La ampliación de la linfadenectomía, a fin de estudiar la afectación ganglionar, es importante en tumores de alto riesgo ( $\geq cT3a$  y/o  $PSA > 20ng/ml$  y/o  $Gleason \geq 8$ ). Por otra parte, es importante preservar las bandeletas nerviosas si oncológica y técnicamente es factible a fin de conservar la capacidad de erección espontánea del paciente (46).

La utilización del *bloqueo hormonal en neoadyuvancia*, no parece ofrecer ventajas en cuanto a la supervivencia libre de progresión bioquímica ni a la supervivencia global con respecto al tratamiento sin neoadyuvancia según un meta-análisis publicado en 2006 (47). Donde existen más controversias es en el *tratamiento hormonal en adyuvancia*: si bien parece ser útil en pacientes con afectación ganglionar macroscópica (48), en casos con afectación ganglionar mínima, no se mostró ningún beneficio en pacientes a los que se añadieron 150 mg/ día de bicalutamida (49).

Otro tratamiento primario del CaP localizado consiste en la *radioterapia*. Esta terapia puede ser bien externa, en la que la fuente de la radiación (generalmente un acelerador lineal de electrones) está fuera del cuerpo del paciente, o bien interna o *braquiterapia*, en la que se insertan en la glándula prostática del paciente unas pequeñas semillas radiactivas, de modo que el tejido diana reciba directamente la radiación (50, 51).

Aparte de la PTR y la radioterapia, existen otros tratamientos más recientes en el CaP primario localizado: *la crioterapia de la próstata* y el *HIFU* (ultrasonido focalizado de alta intensidad) (52). Estos métodos se usan en casos en que no este indicada la PTR, especialmente en tumores órganoconfinados, con un

tamaño  $\leq 40$  ml, PSA sérico  $< 20$  ng/ml, y un grado Gleason en la biopsia  $< 7$  (51). Si bien la crioterapia está aceptada como una técnica ablativa en CaP de bajo riesgo o en rescate a progresión post radioterapia, el HIFU se considera aún una técnica en investigación y no está aceptada por todas las asociaciones urológicas.

### **1.2.2.- Terapia hormonal.**

El objetivo de la terapia hormonal es reducir drásticamente la cantidad de andrógenos circulantes, y por tanto intracelulares, del paciente, ya que el crecimiento de los tumores prostáticos es dependiente de estas hormonas hasta fases muy avanzadas de la enfermedad, donde el tumor se hace resistente a los mecanismos de privación hormonal. Ahora bien, este enfoque terapéutico siempre es paliativo y no curativo. Esta terapia puede consistir en una orquiectomía o bien en tratamiento farmacológico, en el que actualmente se emplean agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) porque evitan las secuelas físicas y psicológicas de las terapias quirúrgicas (53, 54). Las indicaciones de este enfoque son en casos localmente avanzados de entrada, en recidivas de CaP tratados con otras técnicas, en fase metastática o en adyuvancia o neoadyuvancia a PTR o radioterapia (51)

### **1.2.3.- Seguimiento de pacientes con CaP.**

A los pacientes con CaP se les somete a un seguimiento según el grado de la enfermedad, y ello depende del método terapéutico realizado de inicio. Están recomendados el ERD y la determinación de los niveles séricos de PSA en cada revisión, mientras que no se recomiendan las técnicas ecográficas ni las biopsias. No existe una recomendación clara a nivel Europeo en cuanto a la periodicidad de dichas revisiones (51), aunque habitualmente se realizan seguimientos cada tres meses desde la intervención hasta el primer año, cada seis meses desde aquí hasta el tercer año, y anualmente a partir de este punto.

### **1.2.4.- Tratamiento del CaP resistente a la castración.**

La efectividad de la terapia hormonal en el CaP es temporal. En cierto punto del tratamiento, tras haber realizado una segunda y/o tercera maniobras hormonales, el tumor prostático deja de responder a la terapia convirtiéndose en resistente a la castración. Este estado se define dependiendo de la actitud terapéutica inicial por unos criterios bioquímicos de progresión de PSA, diferentes para cada abordaje, y/o por progresión clínica independiente del PSA. A partir de este momento, el pronóstico de la enfermedad empeora drásticamente y es necesario cambiar el enfoque terapéutico. Los CaP resistentes a la castración se tratan con docetaxel en combinación con prednisolona (51). Así pues, un problema acuciante a día de hoy es predecir de entrada el momento en el que el tumor

prostático dejará de responder a la manipulación hormonal. Estas resistencias adquiridas por las células tumorales se deben a diversos mecanismos (55).

### **1.3- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.**

El CaP está caracterizado por un amplio abanico de alteraciones a nivel molecular que definen y marcan los distintos estadios de la enfermedad. En el tejido prostático normal, hay una baja proliferación celular compensada con un bajo nivel de apoptosis. En cambio, los tumores prostáticos tempranos, tienen un aumento de 7 a 10 veces en la tasa de proliferación mientras que el CaP avanzado presenta una tasa de disminución de la apoptosis de aproximadamente el 60% (56). Por lo que, si bien en general existe un desequilibrio neto entre ciclo celular y apoptosis en cáncer, en CaP clínicamente localizado tiene importancia la desregulación del ciclo celular, mientras que en estadios avanzados cobra mayor importancia la apoptosis.

#### **1.3.1.- Alteraciones citogenéticas.**

Aunque la caracterización citogenética ha sido muy útil en el estudio de cánceres hematológicos, en tumores sólidos tiene menor uso, debido a la dificultad de cultivo de tejido epitelial (57). De hecho, el CaP es especialmente difícil de estudiar con técnicas citogenéticas porque su bajo índice mitótico hace muy costoso inducir la metafase (58).

Se estima que un 70% de los CaP presentan un cariotipo normal (59). Entre el resto de casos, la inestabilidad genómica es un mecanismo importante en la tumorigénesis prostática. Se han descrito, usando técnicas citogenéticas, pérdidas en 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, 18q y ganancias en 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq. Estas ganancias y pérdidas se concretan en alteraciones en los genes *AR*, *NKX3.1*, *EIF3S3*, *myc*, *PDP*, *PABPC1* y *KIAA0196* (60).

#### **1.3.2.- Alteraciones somáticas a nivel de ADN**

Una de las mutaciones más características en CaP son las del gen *SPOP* que codifica para el componente de reconocimiento del sustrato de la *Cullin-3-based E3-ubiquitin ligase*. La frecuencia de estas mutaciones se ha establecido en un 6-13% de los casos. Funcionalmente, la pérdida de función de este gen conlleva la alteración del patrón de expresión génica. (61, 62).

Otra alteración a este nivel es la delección de *NKX3.1* por delección de 8p. Este gen *homeobox* estabiliza a *p53*, inhibe la activación de *AKT* y contrarresta los efectos de la delección de *PTEN* en CaP (63). En modelos murinos la pérdida de

función de este gen produce defectos en la morfogénesis ductal y la función secretora prostática (64).

Hay numerosos genes supresores de tumores implicados en la progresión del CaP, entre los principales están: *Rb*, implicado en la apoptosis en respuesta a andrógenos de células prostáticas (65), *MDM2* regula a p53 y otros moduladores del ciclo celular (66) y *FHIT* relacionado con la extensión extraprostática del CaP (67).

### **1.3.3.- Alteraciones a nivel de ARN**

Existen numerosas anomalías a este nivel. En primer lugar, se ha detectado una sobreexpresión de *c-Myc* asociada con un elevado estadio de Gleason mediante *Northern blot*. Sin embargo, la relación entre este gen y el inicio o la progresión del CaP genera controversia (68). Por otro lado, se ha descrito una estadificación de la enfermedad respecto al estadio de Gleason basada en la expresión de un panel de 86 genes (69). Dentro de este tipo de estudios se han descrito perfiles diferenciales de expresión en factores de crecimiento y genes que codifican para proteínas chaperonas entre otros (70).

### **1.3.4.- Alteraciones a nivel de micro ARN (miARN).**

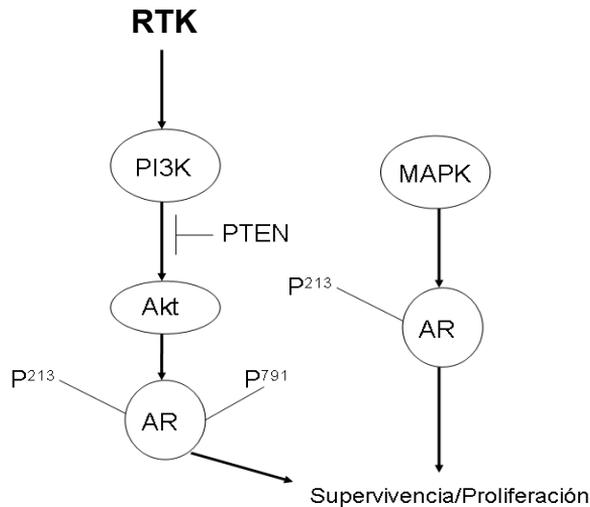
Los miARN son monohebras cortas de ARN no codificante que regulan negativamente la expresión génica. Actúan uniéndose a la región no traducida 3' del ARNm. La expresión aberrante de miARNs está implicada en la iniciación, desarrollo y metástasis del CaP (71).

Existen numerosos miARNs que presentan expresión diferencial en CaP, pero sólo ha sido validada experimentalmente la implicación en la patogénesis del CaP la sobreexpresión de los miARNs oncogénicos: miR-221/-222, miR-21 y miR-125b y la infraexpresión de los miARNs con actividad supresora de tumores como miR-101, miR-126, miR-146a, miR-330, el clúster miR-34 y la familia de miR-200 (71).

En general, como consecuencia de estas alteraciones genéticas o epigenéticas, se producen anomalías constitucionales en la estructura de la proteína o bien en sus niveles de expresión favoreciendo la progresión tumoral y en determinados contextos, la resistencia a castración.

### 1.3.5.- Alteraciones a nivel del receptor androgénico.

La principal vía de señalización implicada en tumores prostáticos es la del receptor de andrógenos (RA), de hecho esta vía se usa como diana terapéutica en CaP primario, aunque llega un momento en que el tumor deja de responder al bloqueo de esta ruta. La principal causa de este fenómeno reside fundamentalmente en alteraciones en el mismo AR (mutaciones y amplificaciones) o a estimulación de receptores tirosina quinasa (EGFR, HER-2, IGF1R, etc...), a citoquinas como la *IL-6*, y también a proteínquinatas tales como: *MEKK-1*, *PKA* y *JAK* implicadas en distintas vías de transducción de señales (Figura 3) (72).



**Figura 3** activación de la ruta del receptor de andrógenos mediada por la vía PI3K/AKT a través de la activación por el receptor con actividad tirosina quinasa (RTK).

### **1.3.6.- Alteraciones de la interacción estroma epitelio.**

El estroma prostático normal secreta numerosos factores paracrinos que promueven el crecimiento y la diferenciación celular. Durante el proceso de tumorigénesis prostática, estos factores pierden su regulación. Entre estos factores se encuentran:

En primer lugar, *EGF* (factor de crecimiento epidérmico, *epidermal growth factor*) y *TGF- $\alpha$*  y  *$\beta$*  (factor de crecimiento transformante, *transforming growth factor*) (73) e IGF1R (receptor del factor de crecimiento derivado de la insulina, *insuline growth factor receptor*) presentan sobreexpresión en tejido tumoral prostático (74).

Por último, otro de los factores paracrinos asociados a la progresión y resistencia a la castración del CaP es IL-6 (interleucina 6) (75).

### **1.3.7.- Alteraciones en la adhesividad celular.**

Una de las alteraciones más tempranas del CaP es la infraexpresión de E-cadherina en la lesión precursora PIN. También infraexpresa la vimentina, proteína componente del citoesqueleto (64). El tumor debe perder su anclaje al tejido tumoral para progresar localmente, pasar a circulación y finalmente proliferar en otro tejido produciendo metástasis. Hay múltiples genes implicados en este fenotipo invasor. Secuencialmente uno de los primeros eventos de la metástasis es la pérdida de expresión por hipermetilación de la región promotora de *KAI1*. Gen situado en 11p11.2 y que pertenece a una familia de moléculas de membrana de leucocitos (76).

Otro gen implicado en los procesos de metástasis es *CD-44* una proteína transmembrana que actúa en la adhesión celular mediante la unión del complejo de la matriz celular. En CaP está infraexpresado por hipermetilación de su región promotora (77).

### **1.3.8.- Inflamación en CaP.**

Se ha descrito que alrededor de un 20% de los CaP están causados por una inflamación crónica que puede ser producida por los siguientes agentes:

Por ejemplo, algunas bacterias y protozoos, causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS), como *Chlamydia trachomatis* (78), *Trichomonas vaginalis* (79), *Treponema pallidum* (80), y otros causantes de infecciones no ETS

## INTRODUCCIÓN

---

como *Propionobacterium acnes* (81) y algunas bacterias gram negativas como *Escherichia coli* (82).

También se han descrito infecciones víricas relacionadas con procesos inflamatorios en CaP como las causadas por el virus del papiloma humano (HPV), virus herpes simplex II (VHS-2) y citomegalovirus (CMV) (83).

Otros causantes no infecciosos de inflamación también podrían estar implicados en la etiología del CaP, como son: el reflujo urinario y trauma físico y químico también están implicados en la etiología del CaP (para revisión (8))

Por otro lado se ha descrito una relación inversa entre el consumo a largo plazo de antiinflamatorios no esteroideos y el CaP, lo que refuerza la hipótesis del papel etiológico de la inflamación en CaP (84).

## 1.4- COMPONENTE HEREDITARIO DEL CaP.

Se estima que entre un 5-10% de los CaP son hereditarios, siendo las familias que cumplen con alguno de estos criterios, las que mayor riesgo tienen de ser portadoras de alguna mutación que justifique ese carácter hereditario: la presencia de tres casos en una familia, la ocurrencia de la enfermedad en tres generaciones sucesivas, o bien dos o más parientes diagnosticados antes de los 55 años (85). Actualmente, no conocemos ningún gen que juegue un papel claro en la predisposición del CaP (85-87). En esta línea, en 1996 fue descrito el gen *HPC1* (hereditary prostate cancer gene 1) y aunque dos estudios refrendaron este hallazgo, ninguno de ellos determinó ligamiento en las familias estudiadas (65, 88, 89). Posteriormente se describió un locus en el brazo largo del cromosoma X (Xq27-28) de susceptibilidad al CaP, pese a que el gen responsable de ello llamado *HPCX* no ha sido establecido aún (90).

El CaP y el de mama tienen muchas características en común. Ambos son hormonodependientes, y tienen tendencia a la metástasis ósea. Además, existen estudios epidemiológicos que han asociado ambas enfermedades (91-93). De hecho, se estima que los sujetos con mutaciones en *BRCA1* (94) o *BRCA2* (95, 96) tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar tumores prostáticos que la población que no porta esas mutaciones.

Nuevos planteamientos técnicos de alto rendimiento, han hecho posible la realización de estudios de asociación de todo el genoma (GWAS). Estos estudios se basan en el desequilibrio de ligamiento mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) representativos de un determinado haplotipo (*tag SNPs*) que ponen de manifiesto la existencia de locus y SNPs relacionados con la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad (97). De este modo se han descrito factores de riesgo hereditarios en CaP: estos factores pueden predisponer, o bien indicar enfermedad más agresiva. En 2006 dos grupos describieron SNPs de riesgo de CaP en 8q24 (98, 99), encontrando SNPs asociados con muerte específica por CaP en los genes *ARVCF*, *LEPR*, *Cry1*, *RNASEL* e *IL-4* (100). Han sido descritos otros SNPs implicados en predisposición a recurrencia temprana como *KLK2*, *KLK3*, *SULT1A1*, *BGALP* y *TLR4* (101, 102)

Otra fuente de variación en línea germinal son las variaciones en número de copias de determinados locus (CNV), que son ganancias o pérdidas de fragmentos de ADN de una longitud de entre unos cuantos cientos de bases a varias Mb. Al igual que los SNPs estas alteraciones confieren susceptibilidad a ciertas enfermedades incluido el cáncer (103-105). Así algunas CNV se han asociado al síndrome de Li-Fraumeni y neuroblastoma (106, 107). En CaP se han detectado este tipo de alteraciones en el gen *UGT2B17* que juega un importante papel en el metabolismo de la testosterona y la dihidrotestosterona (108)

A pesar del gran volumen de información generado por estos trabajos aún no se ha determinado con seguridad ningún gen de susceptibilidad al CaP.

### 1.5.- NUEVOS BIOMARCADORES MOLECULARES EN EL MANEJO CLÍNICO DEL CaP.

Existen numerosos mecanismos moleculares que alteran los niveles de expresión de los genes implicados en la etiología del CaP. Entre estos mecanismos podemos destacar la amplificación génica, miARN, alteraciones en la maquinaria de procesado de ARNm, metilación de las regiones promotoras de determinados genes, cambios en la estructura de la cromatina, etc... (109):

#### 1.5.1.- EPCA.

EPCA (antígeno prostático temprano, *early prostate cancer antigen*) es una proteína sérica determinable por ELISA (110). Biológicamente deriva de la matriz nuclear. Existen dos isoformas de esta proteína, EPCA-1, descubierta en primer lugar, y EPCA-2 que discrimina entre pacientes con tumores extraprostáticos de otros órganoconfinados. Se ha publicado que la determinación de esta proteína por inmunohistoquímica podría ser útil también en el diagnóstico del CaP (111, 112).

#### 1.5.2.- GSTP-1.

La superfamilia de enzimas GSTs forma parte de un mecanismo de defensa de la célula contra el estrés oxidativo. En concreto, son responsables de la detoxificación de numerosos xenobióticos mediante la catalización del ataque nucleofílico del glutatión reducido sobre compuestos electrófilos (113, 114). Según su estructura y propiedades inmunológicas y bioquímicas, los miembros de esta superfamilia se clasifican en cuatro grupos;  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  y  $\theta$ .

*GSTP-1* (glutatión-S-transferasa  $\pi$ ) (OMIM 134660) situado en el locus 11q13, es un gen polimórfico que codifica para cuatro isoformas proteicas. Este gen está silenciado epigenéticamente en más del 90% de los tumores prostáticos y en un 70% de las neoplasias prostáticas intraepiteliales (PIN) pero no en tejido prostático normal. Este silenciamiento está causado por hipermetilación del promotor de *GSTP-1*, y está considerado uno de los eventos moleculares más tempranos de la tumorigénesis prostática. Por ello se han llevado a cabo esfuerzos para utilizar este biomarcador como diagnóstico en muestras de orina (113, 115). La mayoría de tumores con esta alteración se asocian también a la hipermetilación de otros genes como *p16INK4A* (9p21), *p14ARF* (9p21) y *MGMT* (10q26) (116).

### **1.5.3.- *AMACR*.**

También se ha descrito la sobreexpresión de *AMACR* (5p13.2-q11.1) (OMIM 604489) en un 88% de los CaP. Este gen codifica para  $\alpha$ -metil coenzima A racemasa, enzima implicado en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos largos de cadena ramificada. Estos ácidos no pueden ser metabolizados en las mitocondrias debido a sus carbonos metilados, por lo que deben ser degradados en los peroxisomas. Los ácidos grasos ramificados, especialmente el ácido fitánico, han sido extensamente estudiados dado que están implicados en el CaP, colon, mama y otros, además de en enfermedades neurológicas (114, 117). Se ha propuesto a este enzima como elemento clave en la relación entre el CaP y ciertos hábitos alimenticios como consumo de carnes rojas a la brasa (118). Dada su alta expresión en CaP, algunos autores han desarrollado tests diagnósticos en orina con resultados prometedores (119-121), si bien las series analizadas no son lo suficientemente consistentes como para ofrecer unos datos definitivos.

### **1.5.4.- *PAR-1* y *PAR-2*.**

*PAR-2* (5q13.3) (OMIM 601919), codifica para un receptor acoplado a proteínas G activadas por serín-proteasas específicas, entre ellas *TMPRSS2*. Se considera que juega un papel en el desarrollo de metástasis (122) y sobreexpresa en aproximadamente un 40% de los CaP (123). Por su parte, *PAR-1* (3q13-q21) (OMIM 603065), se asocia a una mayor recurrencia bioquímica (123).

### **1.5.5.- *HEPSIN*.**

*HEPSIN* (*TMPRSS1*) (19q11-q13.2) (OMIM 142440), codifica para una proteína transmembrana con actividad serin-proteasa. Este enzima muestra relación con la metástasis ya que está implicada en la desorganización la membrana basal en modelos murinos de CaP (124). El potencial diagnóstico de este gen en CaP ha sido estudiado con *microarrays* de expresión, que mostraron una clara expresión diferencial de *HEPSIN* en tejido tumoral prostático frente a tejido normal. Sin embargo este marcador no es totalmente específico, ya que también se ha encontrado sobreexpresado en carcinoma de ovario y renal (125).

### **1.5.6.- *Pim-1*.**

*Pim-1* (6p21.2) (OMIM 164690) codifica para una proteína con actividad serina-treonina quinasa (126). Fue descrito como oncogén por su implicación en los linfomas T (127) y posteriormente, fue implicado en otras enfermedades como la leucemia mieloide aguda y otras patologías hematológicas. Tiene una importante función en la regulación de procesos como la apoptosis, el ciclo celular y la regulación transcripcional mediante la fosforilación de proteínas implicadas en estos procesos. La sobreexpresión de esta proteína no es específica del CaP, sino

que también se da en PIN y, por tanto, se trata de un evento temprano en la tumorigénesis (128). Su expresión también correlaciona con un mayor intervalo libre de progresión bioquímica (126).

### **1.5.7.- *SPINK-1*.**

*SPINK-1* (5q32) (OMIM 167790) codifica para una proteína inhibidora de la secreción pancreática de tripsina y está sobreexpresado en aproximadamente un 10% de los casos de CaP. La expresión de este gen es detectable en muestras de orina y parece tener relación con un menor intervalo libre de progresión bioquímica (129). También se ha relacionado la expresión de esta proteína como un evento relativamente tardío en la tumorigénesis prostática y relacionado con la dependencia androgénica del tumor, está considerado como un marcador de mal pronóstico (130, 131). Este marcador también se ha incluido en paneles diagnósticos para detectar CaP en orina (132). Otro aspecto importante de este biomarcador es que constituye una diana terapéutica para el ac monoclonal cetuximab. Este fármaco contra EGFR, también inhibe a *SPINK-1* debido a su alta homología con EGF (133).

### **1.5.8.- *TPD52*.**

*TPD52* (8q21) (OMIM 604068) codifica para *tumor protein D52* cuya función ha sido relacionada con el tráfico intracelular de vesículas. A nivel génico, presenta amplificaciones y aumento de expresión del ARNm en distintos tumores. Además de tumores prostáticos, su expresión está alterada en cáncer de mama (134, 135), ovario (136, 137) y colorectal (138). Citogenéticamente, la pérdida del brazo corto del cromosoma 8 se considera un evento temprano en la tumorigénesis prostática, mientras que la ganancia del brazo largo del mismo cromosoma, en el que se sitúa el gen *TPD52*, se considera un evento más tardío asociado con la progresión del CaP (139, 140). Este locus también alberga a *Elongina C* (8q21) (141) y a *N-myc* (8q24) (60, 142, 143) ambos oncogenes relacionados con el CaP. Para revisión (144, 145), existiendo además una relación entre la expresión de este gen y una recurrencia bioquímica tumoral (146).

### **1.5.9.- *PTEN*.**

El gen supresor de tumores *PTEN* (10q23.3) (OMIM 601728), homólogo de la fosfatasa y la tensina, codifica para una proteína de 403 aminoácidos situada en la membrana plasmática y en el núcleo. El gen, descrito en el año 1997, actúa como supresor de tumores. Se presenta frecuentemente inactivado en numerosos tumores, incluido el CaP (147). Se localiza en varios tejidos y su acción antagoniza al efecto proliferativo de muchos factores de crecimiento, en especial IGF-11, de modo que si se pierde la actividad de *PTEN*, se promueve la

tumorogénesis y supervivencia tumoral por activación de la vía PI3K/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (148).

Dentro del CaP la pérdida de función de este gen se ha relacionado con numerosos parámetros y eventos clínicopatológicos. Por una parte, su pérdida favorece la resistencia a hormonoterapia (149) y a quimioterapia (150, 151), además de ser marcador de resistencia a radioterapia (152). A nivel pronóstico, la falta de expresión del gen se correlaciona con metástasis óseas, estadio de Gleason elevado y altos niveles séricos de PSA (153).

Respecto a su mecanismo de actuación PTEN mantiene bajos los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3), catalizando la defosforilación de esta molécula y convirtiéndola así en fosfatidilinositol-(4,5)-difosfato (PIP2). Por tanto, cuando esta proteína está ausente, existe una elevada concentración de productos lipídicos de la vía PI3K y un aumento consiguiente de actividad de proteínas efectoras de esta vía (154). Los efectos fenotípicos de PTEN son mediados también por la vía pAkt activada por PIP3, de modo que la activación de esta ruta confiere al tumor características relacionadas con proliferación y supervivencia celular (155). Estos efectos de Akt están mediados por la regulación del metabolismo glucídico, como demuestra el hecho de que en células privadas de glucosa, esta ruta no inhibe la apoptosis (153). Es más, también se ha demostrado que la activación de la vía AKT/mTOR estimula a HIF- $\alpha$ , que posibilita la glucólisis anaerobia, asegurando la supervivencia celular (156). Por último, la ruta AKT produce una sinergia que favorece la tumorogénesis, ya que se coactiva con mTOR promoviendo la proliferación celular. Ahora bien, los efectos de esta vía no son suficientes para desencadenar todos los efectos protumorales de PI3K, sino que existen mecanismos independientes de AKT que actúan sobre el ciclo celular estabilizando p53 y disminuyendo la actividad de la ciclina D1 (157). Existen otros mecanismos, también independientes de AKT, mediante los cuales PTEN influye en el control de la migración celular y su adhesión fosforilando quinasas (158, 159). Otros mecanismos de acción de PTEN incluyen la regulación negativa de IGF-1R, lo que lleva a una inducción de la proliferación celular y aumento de la apoptosis, y que, por otro lado inhibe a VEGF y disminuyendo la proliferación de células epiteliales. Así pues, tumores con pérdida de expresión de PTEN, tendrán elevada expresión de IGF-1R y VEGF (155). Por último PTEN suprime la señalización de la vía MAPK (160). Dentro de esta ruta, actúa sobre ASK-1 (*apoptosis-signal-regulating kinase 1*), una MAP3-K que desencadena la apoptosis. Dado que pAkt inhibe esta proteína, la pérdida de función de PTEN promueve la supervivencia celular por evasión de la apoptosis (161).

La hiperexpresión de AKT en CaP se debe a la amplificación de su gen o de las quinasas que actúan sobre él, o bien a una pérdida de los reguladores negativos de la vía principalmente PTEN. De todos estos mecanismos, el último es

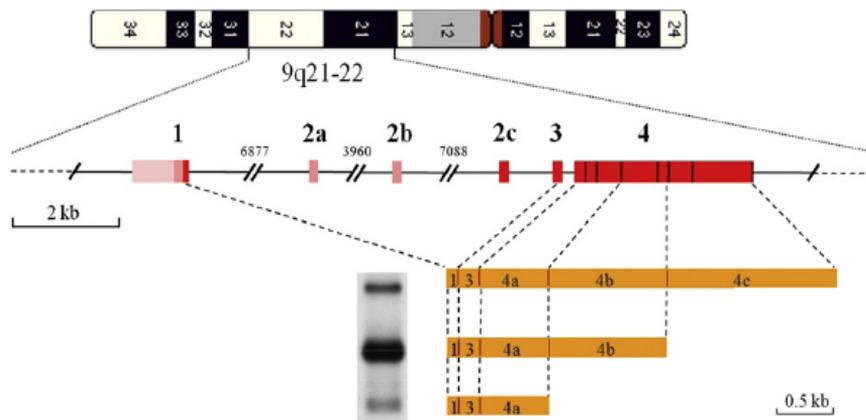
el más importante (158, 160). PTEN CaP, hay tres modos descritos: en primer lugar, la pérdida de heterozigosidad, seguida de mutaciones somáticas y alteraciones epigenéticas, aunque el mecanismo más frecuente es la delección de un alelo acompañada de mutación del otro (162).

En definitiva, todos estos mecanismos hacen a *PTEN* uno de los genes más ubicuamente implicados en la patogénesis molecular oncológica. Por ejemplo, el Síndrome de Cowden (SC) está causado por alteraciones del gen *PTEN*, así como la enfermedad de Lhermitte-Duclos, caracterizada por un gangliocitoma displásico del cerebelo, esta patología junto con el SC parecen ser manifestaciones de una misma enfermedad. Defectos en este gen también causan carcinoma escamoso de cabeza y cuello, glioma familiar del cerebro así como síndrome de macrocefalia y autismo. Por otro lado alteraciones en *PTEN* aumentan considerablemente la susceptibilidad al cáncer de endometrio. Han y cols demostraron una coocurrencia entre la presencia de *TMPRSS2-ERG* y pérdida de *PTEN* en CaP (163).

### 1.5.10.- *PCA3<sup>DD3</sup>*.

*PCA-3* o *DD3* (9q21-22), constituye junto con el PSA, el único parámetro molecular empleado en el manejo clínico del CaP en la actualidad. Se trata de un gen descubierto en 1999 gracias al uso de un análisis diferencial de expresión (*differential display*) entre tejido normal y canceroso de la próstata (164). Estudios posteriores mediante PCR cuantitativa (qPCR) demostraron una expresión relativa de este gen unas 60 veces mayor en tejido tumoral que en normal e HBP (165, 166), no detectándose expresión de *PCA3* en otros tejidos o tumores (164, 165).

Estructuralmente, *PCA-3* está constituido por cuatro exones, de los cuales el segundo se pierde en un 95% de los transcritos por un proceso de *splicing* alternativo (164) (Fig 4). La secuencia del gen tiene muchos codones de stop en el marco de lectura y la falta de una pauta de lectura extensiva sugiere que este gen codifica para un ARN no codificante. Es más, con el descubrimiento de los nuevos sitios de inicio de transcripción, se formarían cuatro nuevas pautas de lectura, con lo que produciría una proteína de 70 a 82 aminoácidos (164, 167) sin ninguna coincidencia con proteínas conocidas (168). Por otro lado se han encontrado estos transcritos dentro del núcleo (169), lo que apoya la hipótesis de un ARN no codificante.



**Figura 4:** Estructura de *PCA-3* situado en el locus 9q21-22. La unidad de transcripción consiste en cuatro exones en rojo (1, 2c, 3 y 4) y tres sitios de poliadenilación en el exón 4. Clarke y col. (167) identificaron dos nuevos exones (2a y 2b), cuatro nuevos sitios de poliadenilación en el exón 4 (líneas verticales) y cuatro nuevos sitios de inicio de transcripción (en rosa en el exón 1). Tomado de Day y cols. (170)

La especificidad de este biomarcador en CaP llevó al desarrollo de métodos de detección trasladables a la práctica clínica utilizando sedimentos celulares de orina centrifugada tras un ERD (166, 171-173) al ser más informativa que en orina directa. Recientemente, Gen-Probe (San Diego, USA) ha desarrollado otro procedimiento para la detección de *PCA-3*, usando transcripción mediada por amplificación y detección con sondas fluorescentes, a partir de orina total en lugar de sedimentos, con lo que es más reproducible que los anteriores (174). La ventaja de este biomarcador con respecto al PSA es que su expresión es independiente del tamaño prostático y de los niveles séricos de PSA (175-177) y lo más importante, que sus niveles de expresión se correlacionan con una mayor probabilidad de una biopsia prostática positiva (175, 176, 178).

Cada vez hay más evidencia de que los niveles de *PCA-3* son mucho más específicos que el PSA para la detección de CaP (179), también en población española con sospecha de CaP (180), por lo que este marcador ha demostrado una utilidad práctica junto con el PSA y el ERD en el diagnóstico precoz del CaP, de forma aislada o en conjunción con otros marcadores moleculares dentro de paneles múltiples en orina. Está en discusión su capacidad pronóstica, habiendo ofrecido resultados controvertidos al respecto (181). Actualmente su uso está aprobado por la FDA en combinación con los niveles séricos de PSA y el ERD para indicar el uso de biopsias repetidas ([www.pca3.org](http://www.pca3.org)).

### 1.6.- GENES DE FUSIÓN Y CÁNCER DE PRÓSTATA.

Los genes de fusión se forman cuando dos regiones cromosómicas inicialmente separadas, cambian de posición para unirse, dando lugar, en ocasiones, a un nuevo gen (llamado también gen quimérico) que presenta una nueva función. Dichos genes son resultado de aberraciones cromosómicas estructurales (translocaciones recíprocas, deleciones o inversiones), que han sido descritas en muchos tipos de cáncer (182). No obstante, teniendo en cuenta el tamaño del genoma humano y el bajo porcentaje de ADN codificante, la mayoría de las roturas cromosómicas que finalmente resultan en una translocación balanceada no producirían un efecto fenotípico porque no afectan a regiones codificantes.

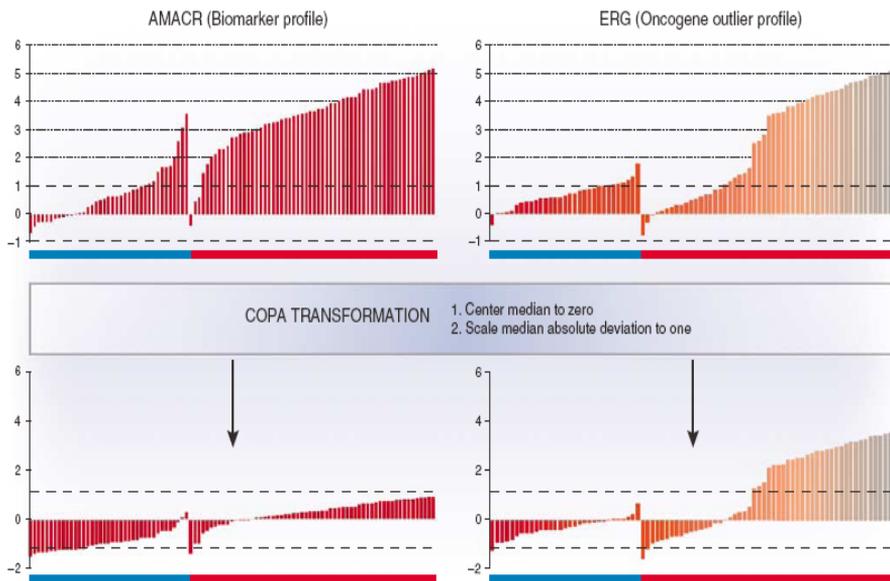
Estos genes quiméricos están extensamente caracterizados en linfomas, leucemias y sarcomas, pero sólo recientemente se han empezado identificar y caracterizar en carcinomas, principalmente en CaP, aunque también en carcinoma papilar y folicular de tiroides, en algunos carcinomas de riñón y mucoepidermoides (183).

En el campo de las fusiones génicas fenotípicamente significativas implicadas en el cáncer, es posible diferenciar dos grandes grupos. En el primero, se produce la sobreexpresión de un oncogén, como por ejemplo sucede en dermatofibrosarcoma protuberans donde en el 95% de los casos hay una sobreexpresión de *PDGFB* como resultado de la fusión *COL1A1-PDGFB*, donde la región promotora y parte de la región codificante de *COL1A1* se fusiona con la región codificante de *PDGFB*. En el segundo grupo el resultado es una proteína quimérica que implica a un factor de transcripción, como es el caso de *EWS-FLI1* en sarcomas de Ewing (184).

Técnicamente, la identificación de genes quiméricos escapa a las técnicas de alto rendimiento (*arrays* de ADNc), no obstante en conjuntos de datos obtenidos en estos experimentos de expresión, pueden ponerse de manifiesto reordenamientos génicos y alteraciones de número de copias siempre que se usen tratamientos analíticos no tradicionales para el procesamiento de los datos. El test de la T de Student, por ejemplo, detecta genes que sobreexpresan constantemente en un determinado tipo de cáncer, si bien no es efectivo a la hora de poner de manifiesto genes que sobreexpresan en un subconjunto de tumores dentro de un determinado tipo de cáncer (*outliers*) (185). A pesar de que, en estadística, el término *outlier* indica medidas que exceden la tasa de variación esperada en un conjunto de datos, en biología, este término es aplicable al análisis de procesos derivados de la progresión tumoral. Por tanto el concepto de *outlier* tiene un significado peyorativo en estadística mientras que en investigación biológica del cáncer, y principalmente usando técnicas de alto rendimiento, tiene un valor

positivo (186). En este sentido, en el año 2005, la revista *Science* publicó un artículo del grupo de Arul M. Chinnaiyan de la Universidad de Michigan en el que se pone a punto un método bioinformático denominado COPA (*Cancer Outlier Profile Analysis*). Dicho test busca encontrar y poner de manifiesto genes con perfil de *outliers*, o lo que es lo mismo que sobreexpresan en un subconjunto de los casos de CaP. Para ello se usó un método no paramétrico a partir de datos de 10.486 experimentos de *microarrays* contenidos en la *Oncomine Database* (<https://www.oncomine.org/>) (185). En el desarrollo de este método subyace la idea de que con la evaluación de la varianza usando la mediana en lugar de la media, se mantendrán los picos de expresión de los genes que sólo sobreexpresan en un subconjunto de los datos. Concretamente, se centran los valores de expresión con la mediana, escalando dicha mediana a cero.

En un segundo paso, es calculada la desviación absoluta de la mediana (MAD) y se escala a uno, dividiendo cada valor de expresión génica entre su MAD. Cabe señalar que este enfoque tiene mayor efecto en la cola de *outliers* que centrar con la mediana. Por último, se tabulan los percentiles 75°, 90° y 95° de la expresión transformada para cada gen y se ordenan los valores, lo que genera una lista priorizada de genes con perfiles de *outlier* para un determinado gen (186, 187). A modo de confirmación, en este análisis se incluyeron genes con una sobreexpresión conocida para un determinado tipo de cáncer, como el caso de *RUNX1* en leucemias. Los genes *ERG* (21q22.3; OMIM:165080) y *ETV1* (7p21.2; OMIM: 600541) fueron los que presentaron un mayor perfil de outliers para el CaP. Ambos genes son factores de transcripción de la familia ETS (E26) implicados en procesos de proliferación celular (Figura 5).



**Figura 5:** esquema del procedimiento analítico en tres pasos de los que consta el método de análisis de expresión COPA, tomado de (187).

El patrón de expresión de estos factores de transcripción de la familia ETS es mutuamente excluyente en un subconjunto de casos de CaP. Este comportamiento es común a otros tumores, como el sarcoma de Ewing, en el que la sobreexpresión de estos genes está relacionada con fusiones génicas *EWS-ETS* (188). Partiendo de esta analogía, el grupo de Chinnaiyan formuló la hipótesis de que la sobreexpresión de *ERG* y *ETV1*, podía deberse a una fusión génica. Para comprobar esta hipótesis, era necesario caracterizar el gen unido en 5' a *ERG* o *ETV1*. Con este fin, emplearon la técnica de amplificación rápida de extremos de ADNc (RLM-RACE), encontrando al gen *TMPRSS2* en posición 5' del gen de fusión recién descubierto. Complementaron el estudio con un experimento en líneas celulares establecidas a partir de células tumorales prostáticas. Una de las líneas portaba el gen *TMPRSS2-ERG*, mientras que la otra no. Los medios de ambos cultivos fueron suplementados con andrógenos sintéticos y en ambos casos se produjo sobreexpresión de *PSA*, mientras que sólo la línea celular con el gen de fusión (VCaP) sobreexpresó también *ERG*, lo que demuestra que la sobreexpresión del factor de transcripción de *TMPRSS2-ERG* viene determinada por la presencia del gen de fusión y que es sensible a andrógenos (Tomlins, Rhodes et al. 2005). Este descubrimiento abrió varios nuevos frentes en la investigación de la biología del CaP. En primer lugar fue el primer gen de fusión descrito en un carcinoma, lo que deja la puerta abierta a aplicar el método COPA en otros tumores de origen epitelial; en segundo lugar, tiende un puente entre la biología molecular del CaP y la dependencia androgénica de este tipo de tumores; y por último, tiene también una serie de implicaciones muy interesantes en la

clínica más allá del diagnóstico y el pronóstico, por ejemplo en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y el estudio de la clonalidad y metástasis del CaP (129).

## **1.7.- IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE *TMPRSS2-ERG*.**

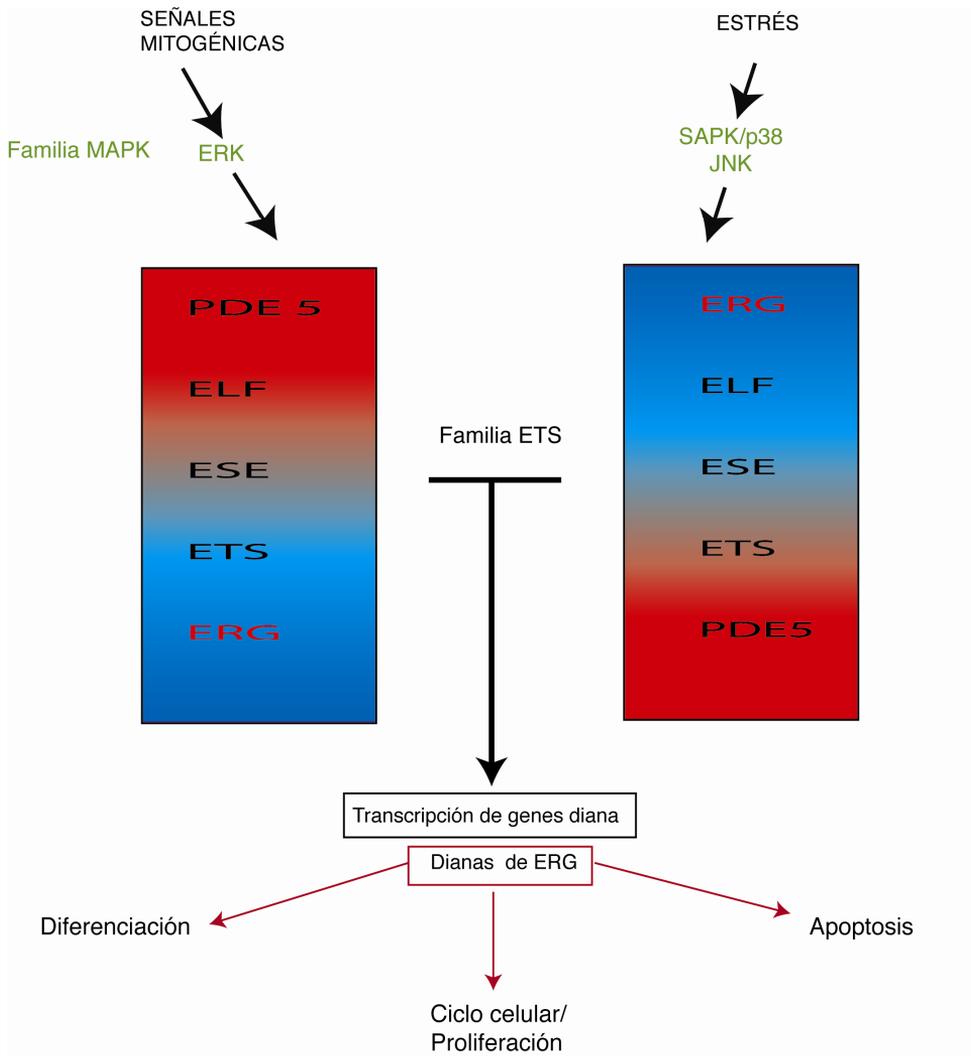
### **1.7.1.- Características biológicas de *TMPRSS2-ERG*.**

*TMPRSS2* está situado en el locus 21q22.3 y codifica para una proteína transmembrana de la familia STP (serín proteasa transmembrana de tipo II) con estructura multimérica. *Matriptasa* y *hepsin* (*TMPRSS1*) son miembros de la misma familia y también sobreexpresan en CaP (189). Esta proteína tiene actividad como receptor y está formada por un dominio proteasa de la familia S1, un dominio LDLRA que forma un sitio de unión para el calcio, y un tercer dominio transmembrana. *TMPRSS2* está regulado por andrógenos, se encuentra en el proteoma del fluido seminal normal y está muy expresado en tejido prostático y, en menor medida, en tejido epitelial de colon, estómago, epidídimo y mama (189). Funcionalmente, al activarse esta proteína, el dominio serínproteasa se libera de la superficie celular al espacio extracelular y activa a PAR-2 (receptor activado proteasa), que como se ha mencionado anteriormente es un receptor G que juega un papel importante en la metástasis del CaP (122). No obstante, la significación de *TMPRSS2* no está muy clara ya que en modelos murinos *knock-out* para este gen mostraron un fenotipo normal, lo que podría indicar que se trata de un gen redundante (190). La sobreexpresión de *TMPRSS2* parece estar estrechamente relacionada con la presencia de andrógenos, ya que en la región promotora del gen existe un elemento de respuesta a dichas hormonas (191).

Por su parte, la familia ETS de factores de transcripción está formada por 27 miembros. Según el contexto celular, pueden actuar como transactivadores o transrepresores. Los genes de esta familia modulan muchas funciones celulares, entre ellas la proliferación, apoptosis, diferenciación, remodelado tisular, invasión y angiogénesis (192, 193). Las alteraciones en la expresión o mutaciones de estos genes afectan al control de estos procesos (194). De los genes de esta familia, el más importante en CaP es *ERG* (21q22.2) que codifica para una proteína nuclear de 363 residuos que se une específicamente al ADN en regiones ricas en purina (195). Este factor de transcripción está formado por 17 exones que abarcan 300 kilobases y genera, al menos, 9 isoformas por splicing alternativo, de las cuales, 7 codifican para proteínas. Este gen se expresa en tejidos endoteliales, células hematopoyéticas, riñón y tracto genitourinario. Concretamente en CaP, *ERG* es el gen más persistentemente sobreexpresado en, al menos, un 85 % de los casos (196). La familia ETS está caracterizada por la presencia en todos sus miembros de dominios ETS de unión al ADN y varios dominios de unión a proteínas. Concretamente, *ERG* interactúa con metiltransferasas histona H3 específica

## INTRODUCCIÓN

(ESET), pudiendo, por tanto participar en el silenciamiento epigenético de otros genes (197). Una hipótesis de la actuación de este gen en CaP sería que responde a señales mitogénicas y de estrés transducidas por la vía de las MAPK, actuando sobre genes diana causantes del proceso de tumorigénesis (Figura 6). Petrovics y cols. demostraron el valor pronóstico independiente de este gen en análisis multivariante, objetivado en una recurrencia bioquímica temprana tras prostatectomía radical (196).



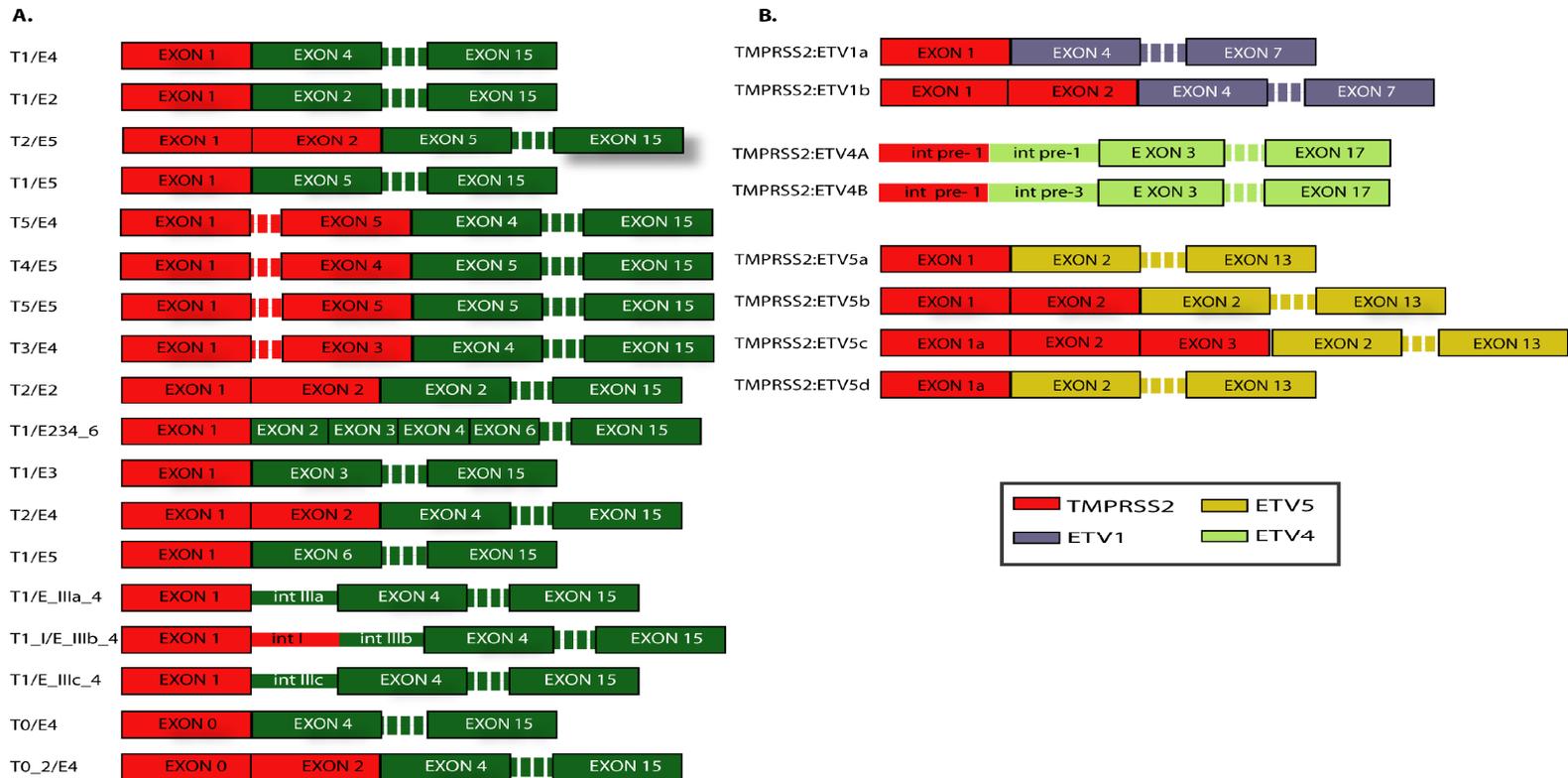
**Figura 6:** Actuación de los factores de transcripción de la familia ETS sobre reacciones de estrés mediadas por la vía de transducción de señales de las MAPK, adaptado de Petrovics y cols. (196). El fondo rojo indica sobreexpresión del gen y el azul infraexpresión. Resaltado en rojo *ERG*.

*TMPRSS2* y *ERG* tienen la misma orientación transcripcional, por lo que la fusión de ambos genes se debe principalmente a una deleción intersticial en la que se pierde una región de aproximadamente 3 megabases (Mb) en el locus 21q22 y, en menor medida, a una translocación recíproca (129). Dicha anomalía génica se da en aproximadamente un 50% de los casos de CaP (198) En los casos delecionados, la región que se pierde en el brazo largo del cromosoma 21 contiene 15 genes, de los cuales al menos dos (*ETS2* y *HMGNI*) han sido relacionados con la progresión del CaP (199).

Desde el descubrimiento inicial de dos fusiones implicando a los genes *TMPRSS2* y *ERG* y otras dos isoformas de *TMPRSS2-ETV1* por el grupo de Chinnaiyan en 2005 (185), se han descrito muchas otras formas. Actualmente hay publicadas 20 fusiones implicando a *ERG*, otras dos implicando a *ETV4* (200) y otra a *ETV5* todas con *TMPRSS2* en posición 5'. También se han caracterizado fusiones con otros genes en 5' como *SLC45A3* (OMIM:605097) (1q32.1) (201) (Tabla 2). Estas últimas translocaciones aunque interesantes desde el punto de vista biológico tienen un potencial clínico bastante limitado debido a sus bajas incidencias (1-4%) (Figura 7).

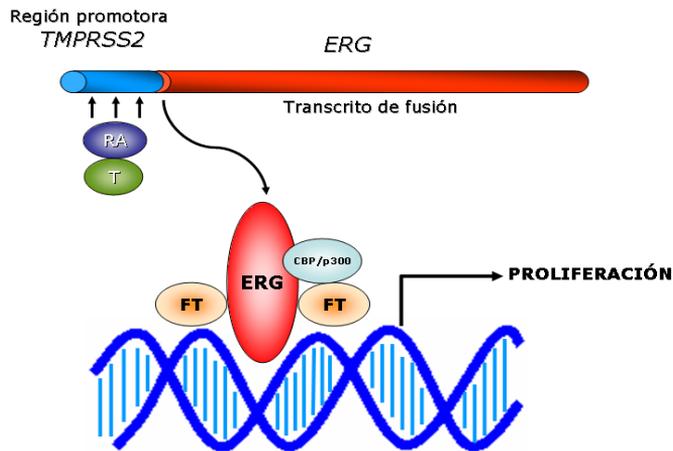
**Tabla 2:** Fusiones génicas descritas en CaP que no implican a *TMPRSS2* o a *ERG* y que son minoritarias en cuanto a incidencia aunque presentan gran interés en la elucidación de mecanismos moleculares implicados en el CaP.

Gen en 5'	Gen en 3'	Frecuencia	Ref.
<i>FOXP1</i>	<i>ETV1</i>	< 1%	(194)
<i>EST14</i>	<i>ETV1</i>	< 1%	(194)
<i>HERVK17</i>	<i>ETV1</i>	< 1%	(194)
<i>SLC45A3</i>	<i>ETV5</i>	1,5%	(201)
<i>HERV-K-22q11.23</i>	<i>ETV1</i>	1%	(202)
<i>SLC45A3</i>	<i>ETV1</i>	1%	(202)
<i>C15orf21</i>	<i>ETV1</i>	1%	(202)
<i>HNRPA2B1</i>	<i>ETV1</i>	1%	(202)
<i>SLC45A3</i>	<i>ELK4</i>	-	(203)
<i>NDRG1</i>	<i>ERG</i>	<2%	(204)
<i>KLK2</i>	<i>ETV4</i>	<1,4%	(194)
<i>CANTI</i>	<i>ETV4</i>	<1,4%	(194)



**Figura 7:** A) Isoformas descritas hasta la fecha del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* que dan idea de la gran inestabilidad de este reordenamiento. B) Otros genes de fusión minoritarios que implican a distintos genes (generalmente hormonoregulados) en 5' y a otros factores de transcripción de la familia ETS en posición 3'.

La expresión de las variantes génicas de *TMPRSS2-ETS* parecen tener una estrecha relación con la señalización androgénica ya que porta los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) de la región promotora de *TMPRSS2*. Hermans y cols. describieron que la fusión génica *TMPRSS2-ETS* es clave en la respuesta de los tumores prostáticos a hormonas androgénicas, pero que esta vía podría estar no funcionando en los tumores hormonorrefractarios, lo que se objetivaría en una falta de expresión del ARNm en esta fase tardía (191). Por tanto, está desregulación también afecta a todos los genes diana de *ERG*, de los cuales el más frecuentemente cosobreexpresado es *HDAC-1* que cataliza la desacetilación de histonas, y por tanto promueve la expresión génica (205). (Figura 8).

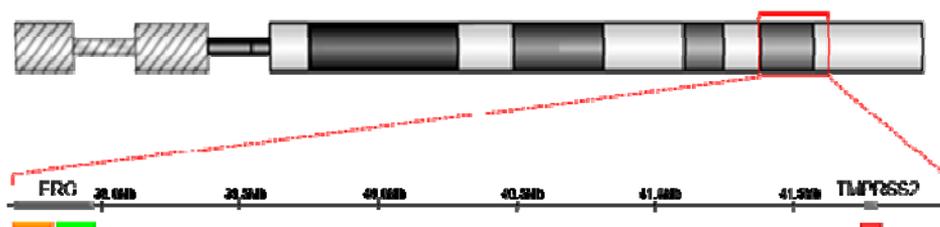


**Figura 8:** modelo del mecanismo de interacción entre *TMPRSS2-ERG* y la vía de señalización androgénica en CaP.

A nivel proteico, casi todos los transcritos del gen de fusión, incluido el más común (exón 1 *TMPRSS2*- exón 4 *ERG* o T1E4) producen principalmente una proteína ERG truncada más que una proteína quimérica (129), ya que la región traslocada de *TMPRSS2* corresponde a la región promotora no codificante del gen.

### 1.7.2.- Génesis de *TMPRSS2-ERG*.

Un trabajo publicado en *PNAS* en 2008 por Hu y cols. estableció que la acción de hormonas estrogénicas induce un movimiento cromosómico que une genes de unión con el receptor estrogénico  $\alpha$  con diferentes cromosomas en el cáncer de mama (206). Dada la analogía del comportamiento estrógeno-dependiente de este tipo de cáncer con la dependencia de andrógenos del CaP, Mani y cols. demostraron que el mecanismo de reordenamiento que dará lugar a *TMPRSS2-ERG* en CaP es análogo al del cáncer de mama. A tal fin cultivaron en presencia de andrógenos sintéticos la línea celular LNCaP que no porta el gen de fusión pero es hormonosensible. A modo de control dieron el mismo tratamiento a otra línea sin gen de fusión y que no responde a andrógenos y, posteriormente, irradiaron ambos cultivos. En el primero, se encontró la presencia de *TMPRSS2-ERG* en un 25 % de los clones, mientras que en el segundo no se encontró el gen de fusión. Este hecho indicaría que el mecanismo de fusión es la inducción de la proximidad de los locus *TMPRSS2* y *ERG* en el cromosoma 21 (Figura 9), lo que concomitantemente con otros factores carcinógenos dará lugar a la tumorigénesis prostática. Por otro lado, este mecanismo también explicaría la especificidad de *TMPRSS2-ERG* en tumores prostáticos debido a su naturaleza androgénica (207). Ahora bien, no se presenta este reordenamiento génico en todos los CaP hormonodependientes porque se necesitan otros factores concomitantes para que la cercanía se traduzca en una fusión génica.



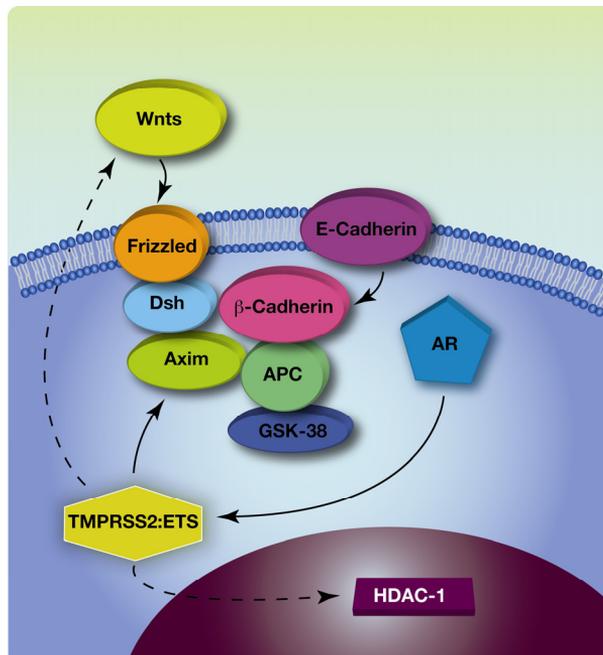
**Figura 9:** Posición de *TMPRSS2* y *ERG* en el cromosoma 21-Tomado de Atlas of Genetics Oncology. <http://goo.gl/1Dazr>.

### 1.7.3.- Rutas biológicas relacionadas con *TMPRSS2-ERG*.

La fusión *TMPRSS2-ERG* ocurre en el contexto de lesiones génicas preexistentes como la pérdida de un alelo de *PTEN* o *NKX3.1* (208). Por otro lado, la fusión interactúa indirectamente con *E-cadherina* (*CDH1*) que es clave en el

mantenimiento de la arquitectura tisular normal y por tanto inhibe la metástasis. Este gen se encuentra frecuentemente hipermetilado en CaP (205). Además *ERG* cosobreexpresa con *EZH2*, gen clave en el silenciamiento epigenético (209, 210). Carver y cols. encontraron que *ERG*, *TDRD1* y *KCNH8* son los genes más cosobreexpresados en CaP con el gen de fusión, el primero de ellos, a su vez, regula directamente a *CXCR4* y a *ADAMTS1* (211). *TMPRSS2-ERG* también cosobreexpresa con *BRaf* (212). A nivel proteico, el gen de fusión activa a las proteínas c-myc y c-jun en epitelio prostático primario induciendo el paso del ciclo celular de la fase G1 a la S (213).

Globalmente, la sobreexpresión de *ERG* puede conducir a alteraciones en la ruta Wnt, responsable del dispositivo que la célula necesita para proliferar, así como a la reprogramación epigenética y desregulación de vías de muerte celular (214). También es muy significativa la implicación del receptor de andrógenos (RA) que actúa como regulador maestro de la progresión de la transición de las fases G1-S del ciclo celular induciendo señales que promueven G1 (4) como puede verse en la figura 10.



**Figura 10:** Mecanismo molecular de interacción de *TMPRSS2-ERG* con las vía de señalización de hormonas androgénicas características del CaP. Adaptado de Joshua et al. (205)

También hay una marcada cooperatividad entre la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y la vía PI3K, que juega un papel fundamental en el metabolismo de la célula tumoral. Por un lado, se ha demostrado la correlación existente entre la presencia del gen de fusión, deleciones en *PTEN* y expresión de *MYC*; y, en segundo lugar, modelos murinos transgénicos para el gen de fusión desarrollan PIN, pero sólo en el contexto de una activación generalizada de la vía PI3K (215). De hecho, hacen falta eventos génicos concomitantes para que la lesión progrese a CaP por diferentes vías alternativas (212, 215). La presencia del gen de fusión junto con deleción en *PTEN* tienen un efecto aditivo que parece relacionarse con el aumento de movilidad celular y con la transición epitelial mesenquimal (212).

## 1.8.- SIGNIFICADO CLÍNICO DE *TMPRSS2-ERG*.

### 1.8.1.- Implicaciones diagnósticas y pronósticas.

El descubrimiento de la familia de genes de fusión *TMPRSS2-ETS* tiene varias facetas especialmente interesantes desde un punto de vista clínico: por una parte, puede contribuir a elucidar funcionalmente el comportamiento hormonodependiente de los tumores prostáticos; en segundo lugar arroja interesantes posibilidades diagnósticas y pronósticas; y además, puede constituir una diana terapéutica (216).

Si bien existen numerosas fusiones que involucran a *TMPRSS2* y otros miembros de la familia ETS, en adelante se revisará exclusivamente *TMPRSS2-ERG*, dado que se trata del gen de fusión más incidente y el que ha sido más ampliamente estudiado (185).

*TMPRSS2-ERG* presenta una frecuencia del 40-70% en carcinomas prostáticos, hecho orientativo de su potencial utilidad como biomarcador oncológico (185, 217, 218). Aunque existen muchas variantes de reordenamientos implicando a ambos genes, la mayoría implican al exón 1 de *TMPRSS2* y al 4 de *ERG* (T1E4), seguida de la fusión de los exones 1 de *TMPRSS2* con el 5 de *ERG* (T1E5). Conjuntamente, ambas fusiones representan aproximadamente el 80% de estos reordenamientos (185, 217).

La mayoría de los puntos de ruptura de *ERG* se producen en la última parte del intrón 3, lo que sugiere que esta zona constituye una región prioritaria de recombinación (191). Actualmente se desconocen las causas de la elevada frecuencia de *splicing* alternativo de *TMPRSS2-ERG* aunque posiblemente la isoforma más común (T1:E4) favorezca el crecimiento tumoral (191). Los transcritos T1E4 y T1E5 suelen darse en la misma muestra, lo que parece sugerir que son productos de *splicing* alternativo de un solo ARNm, si bien el resultado funcional de ambas isoformas codifican para una proteína ERG truncada N-terminal (219). Algunos autores han descrito una isoforma más rara, en la que un primer exón alternativo de *TMPRSS2* (exón 0) se fusiona con el exón 4 de *ERG* relacionándolo con un mejor pronóstico (220). Hay otras 18 isoformas del gen de fusión descritas hasta la fecha, aunque ninguna de ellas tiene una frecuencia comparable a la citada T1E4 (219) (Figura 7 Pág. 32 ).

La carcinogénesis prostática es, por lo general, un proceso multifocal en el cual coexisten dos o más vías patogénicas que pueden conllevar o no el curso de la vía ETS (221). Por tanto, el CaP se puede considerar como un conjunto heterogéneo de enfermedades originadas en expansiones clonales múltiples e independientes. Una forma de determinar la clonalidad de un tumor prostático es

determinar la presencia y la isoforma de *TMPRSS-ERG* en los distintos focos del tumor y en la metástasis. En este sentido, algunos autores han descrito focos en una misma próstata portando distintas isoformas del gen de fusión o sin tenerlo, e incluso, dos isoformas en el mismo foco. Ahora bien, todas las metástasis de un mismo caso presentan el mismo *status* para el reordenamiento lo que indica que un solo clon evoluciona de la localización primaria para hacer metástasis (222).

A nivel diagnóstico, el potencial de la detección de *TMPRSS2-ERG* es innegable, dada su elevada especificidad. Si bien está perfectamente establecida la presencia del gen de fusión en piezas quirúrgicas congeladas (185, 218) y en piezas fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) (217, 223), tiene un evidente interés la determinación en otras muestras menos invasivas como sangre (224, 225) y orina (226). En el primer caso se desarrollará más adelante la determinación de células tumorales circulantes (CTC) en pacientes oncológicos y más concretamente en CaP. En cuanto a las muestras de orina, también es muy interesante el la detección del gen de fusión como biomarcador de CaP en células descamadas del tumor después de un masaje prostático (227).

Hay numerosas evidencias que parecen apuntar al hecho de que los CaP que contienen el gen *TMPRSS2-ERG* y los que no lo portan constituyen dos grupos diferenciados dentro de la enfermedad. Por una parte, un estudio de expresión génica reveló que los tumores con el gen de fusión tienen distinto perfil transcriptómico. En concreto hay 87 genes relacionados con la vía de señalización de las hormonas estrogénicas que están sobreexpresados en los tumores *TMPRSS2-ERG* positivos con respecto a los casos que no portan este gen (228).

Las implicaciones pronósticas de *TMPRSS2-ERG* continúan generando controversia aunque existe un gran número de estudios al respecto para revisión (183). Esto puede deberse a la heterogeneidad de las series de casos analizadas y a las distintas técnicas usadas en la determinación: hibridación fluorescente in situ y RT-PCR principalmente, aunque marginalmente también se han usado hibridación genómica comparada y chips génicos de genotipado o de expresión, entre otras (218, 229-236).

Nuestro grupo estudió los factores clinicopatológicos clásicos por análisis multivariante en un amplia serie de pacientes tratados con prostatectomía radical y estratificando la población según la presencia o ausencia del gen *TMPRSS2-ERG*. Los casos con el gen de fusión tuvieron, como factores pronósticos independientes, los niveles séricos de PSA en el momento del diagnóstico, el *score* de Gleason en la pieza de prostatectomía y los márgenes quirúrgicos. Mientras que los casos no reordenados presentaron valor pronóstico: el estadio clínico, el *score* de Gleason y los márgenes, lo que abre la posibilidad de considerar tratamientos más optimizados en función del estatus del gen de fusión y de los distintos paneles de factores pronósticos observados (217).

Un argumento que también parece apoyar la estratificación molecular del CaP en función del gen de fusión como tumores con un comportamiento biológico diferente es la distribución geográfica de las anomalías génicas. Está bien establecido que la población oriental tiene una menor incidencia de tumores prostáticos que los occidentales, además, Mao y cols. han publicado recientemente que esta diferencia en incidencia lleva aparejadas diferencias génicas. Mientras que la frecuencia de reordenamiento *TMPRSS2-ERG* ronda el 50% de los casos en occidentales, en población china sería de un 2,5%, y las deleciones del gen *PTEN*, con una frecuencia aproximada del 40% en población occidental, sólo tendrían una incidencia del 7,6% en chinos (237).

### **1.8.2.- *TMPRSS2-ERG* como diana terapéutica.**

Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que el gen de fusión se exprese específicamente en células tumorales de CaP lo convierte en una potencial diana terapéutica del máximo interés. Su principal inconveniente para esta función es la dificultad que presenta el acceso de fármacos hasta el gen, lo que hace que la inhibición selectiva de factores de transcripción anormalmente activados, de localización nuclear, sea menos factible que la de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa como KIT, HER2 o VEGFR frente a los cuales ya existen una amplia variedad de fármacos en el mercado (238).

Por otro lado, Stegmaier y cols desarrollaron un método para identificar inhibidores de fusiones ETS que consiste en analizar un perfil de expresión inhibidor de *EWS-FLII* en líneas celulares y probar sobre ellas una librería de moléculas pequeñas mediante la técnica de amplificación mediada por ligación. Usando esta estrategia se descubrió que el arabinósido de citosina actúa como modulador en CaP que porta *TMPRSS2-ERG* (129, 239).

En fase de investigación existen varios planteamientos actualmente. En primer lugar, en experimentos con las líneas celulares VCaP y DuCaP (ambas sobreexpresan *ERG* pero sólo la primera porta el gen de fusión), el tratamiento con inhibidores de HDAC (por ejemplo trichostatina) reduce drásticamente el crecimiento celular (214). Además, estos mismos casos *TMPRSS2-ERG* + parecen responder bien a fármacos con actividad agonista del receptor de estrógenos (RE)  $\alpha$  y antagonista de RE  $\beta$  (228). Otro enfoque ya en fase de ensayos clínicos es el uso de acetato de abiraterona tanto previo como posterior a la quimioterapia. Este fármaco bloquea la vía de señalización androgénica mediante la inhibición del citocromo P17 (240). Estos ensayos presentaron resultados prometedores en casos con *TMPRSS2-ERG* (129), de hecho la mayoría de los pacientes que portaban el gen de fusión disminuyeron a la mitad los niveles séricos de PSA. En teoría es posible que los enfermos portadores de CaP con reordenamientos *ETS* puedan responder de modo distinto a la terapia antiandrogénica de aquellos no portadores (240). Por último, la terapia con ARN de interferencia debería actuar bien frente a

*TMPRSS2-ERG* dada su alta especificidad. A pesar del potencial de este campo a fecha de hoy no se ha desarrollado su uso clínico (208).

### **1.10.- CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.**

El hecho de contar con un biomarcador altamente específico de CaP como es el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* abre la posibilidad de poder usarlo como herramienta diagnóstica especialmente en contextos clínicos de progresión y diseminación de la enfermedad como subrogado de la presencia de células tumorales circulantes (CTC).

La detección de CTC como indicador de enfermedad diseminada es un campo en rápida expansión dentro de la oncología. Si bien su uso clínico como biomarcador está bien establecido en cánceres hematológicos, en tumores sólidos como el de mama y el de próstata aún está en discusión (241-243).

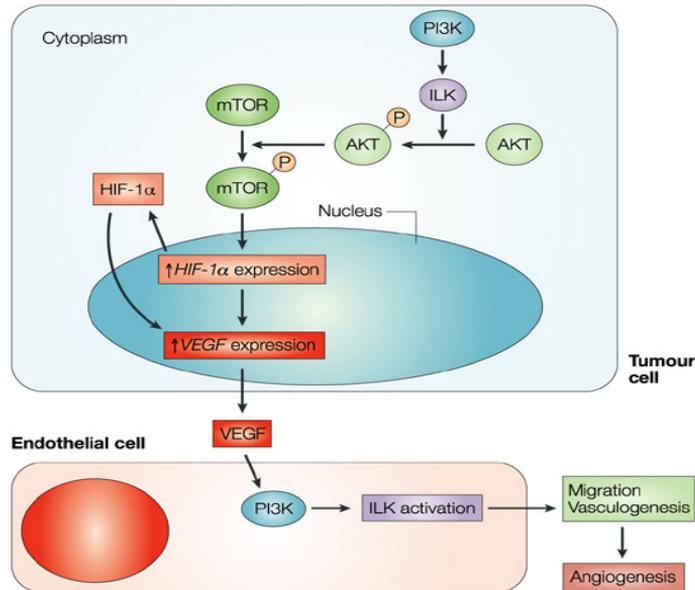
#### **1.10.1- Enfermedad mínima residual.**

La enfermedad mínima residual (EMR) es el número de células malignas que persisten tras el tratamiento de un tumor. Esta cantidad de células está por debajo del umbral de detección de las técnicas diagnósticas disponibles. Aunque la EMRs más estudiadas han sido leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda, también se han descrito en menor medida en tumores sólidos. La EMR representa la carga tumoral mínima detectable y la identificación de CTC en sangre periférica es una posible herramienta para su monitorización, si bien no todas las CTC detectables presentan capacidad de producir un nuevo episodio de enfermedad (244, 245). Además de las células aisladas, también pueden viajar en el torrente sanguíneo microémbolos tumorales, considerados de mayor potencial metastásico (245).

#### **1.10.2- Transición epitelial mesenquimal, transición mesenquimal epitelial y capacidad angiogénica de las células tumorales.**

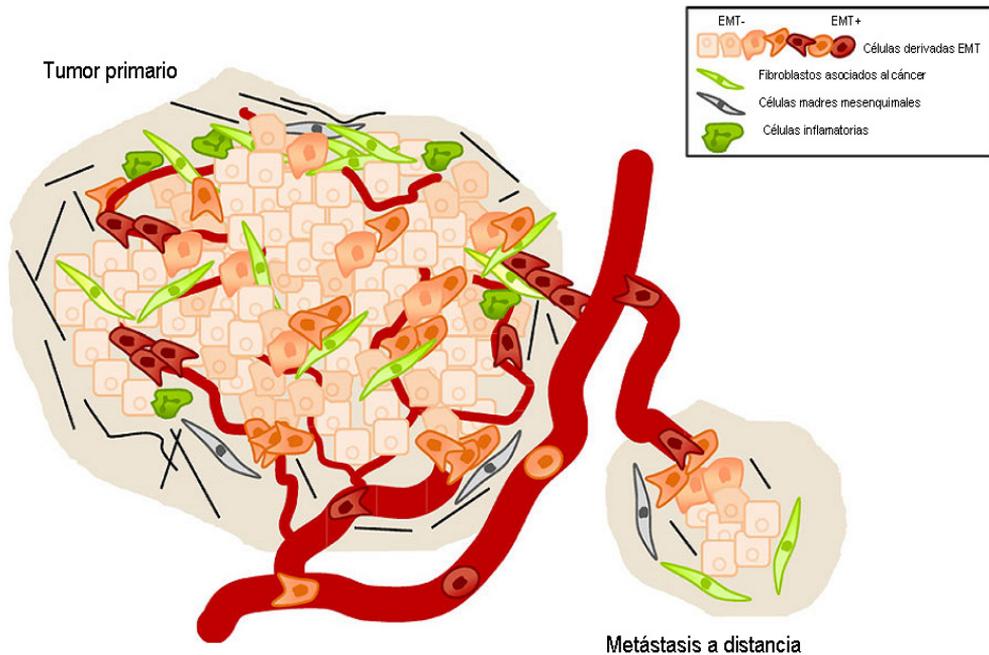
Los tumores sólidos necesitan un aporte adicional de flujo sanguíneo, dado que tienen una tasa metabólica mayor que el tejido sano. Con este objetivo, desencadenan una serie de mecanismos que ponen en marcha el proceso de angiogénesis que garantice el aporte de nutrientes y oxígeno. Este proceso es activado por las propias células tumorales que secretan a la matriz extracelular una serie de factores pro-angiogénicos, como *VEGF* y *HIF $\alpha$*  (figura 11), que estimulan a las células endoteliales y por tanto la formación de nuevos capilares. Estos microvasos contienen células tumorales intercaladas entre las células endoteliales,

hecho que los hace más permeables que los vasos normales y que implica una inadecuada irrigación de los tumores, que presentarán zonas de necrosis y otras de hemorragia. Sin embargo, esta alta permeabilidad también conlleva que las células del tumor sólido puedan alcanzar más fácilmente la circulación sistémica (246, 247).



**Figura 11:** cascada de señalización de la angiogénesis, proceso fundamental en la progresión de diversos tipos de tumores Tomado de (248)

En conjunto, se considera que las células que componen el tumor sólido tienen que residir en un entorno no más alejado de 100  $\mu\text{m}$  de un vaso sanguíneo. Una vez tienen acceso a la circulación, necesitan desprenderse del tumor. Para ello, tienen que variar su fenotipo, mediante un proceso llamado transición epitelio-mesenquimal (EMT; figura 12). Este proceso consiste en modificaciones proteicas y cambios estructurales que disminuyen la adhesividad intercelular y está mediado por la infraexpresión de la E-cadherina, y de sus marcadores epiteliales (citoqueratinas), aumentando la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina) (249). Hay otras modificaciones que potencian la invasividad de estas células, como es la sobreexpresión de integrinas y la activación de metaloproteinasas. La secreción de citoquinas y factores de crecimiento estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales que favorecen la intravasación (250). Se cree que al alcanzar el órgano diana, las CTCs vuelven a revertir su fenotipo a epitelial llevando a cabo los procesos y transformaciones inversas para proliferar en su nueva localización (251).



**Figura 12:** Proceso de formación de CTC. EMT seguida de intravasación, circulación extravasación en un nuevo tejido y finalmente MET lo que dará la metástasis, tomado de Bonnomet y cols (252).

### 1.10.3- Detección y cuantificación de células tumorales circulantes.

Las CTC son las células presentes en circulación periférica con fenotipo tumoral. Aunque estas células fueron descritas en 1869 (253), ha hecho falta mucho tiempo para disponer de métodos analíticos con sensibilidad suficiente como para poder cuantificarlas (254). Se ha estimado, estudiando modelos animales, que a partir de un gramo de tumor sólido, pueden introducirse aproximadamente un millón de células tumorales en el torrente sanguíneo (255). Sin embargo, en 5 minutos desaparecen el 85% de esas células (256, 257). La detección de CTC tiene muchos usos en oncología, por ejemplo caracterizar el tumor de un modo mínimamente invasivo, monitorizar el tratamiento mediante la

cuantificación de estas células o detectar tempranamente recaídas. Además, constituye un marcador interesante en los ensayos clínicos de nuevos fármacos (254).

### **1.10.3.1- Métodos de enriquecimiento de CTC.**

La presencia de CTC en sangre periférica está muy diluida por otras células, por lo que resulta fundamental aplicar métodos que aumenten la concentración de CTC en la muestra. Para ello se usan técnicas que se apoyan en características morfológicas y fenotípicas como la expresión de proteínas el tamaño y la densidad.

Un primer método de selección consiste en la separación por tamaño de células tumorales epiteliales (ISET). En este proceso, se separan las células que miden más de 8  $\mu\text{m}$ , aunque no está totalmente comprobado que todas las células tumorales sean mayores de ese tamaño, lo que disminuiría la sensibilidad de la técnica (258, 259). Este método se usa habitualmente porque es relativamente sencillo y barato pero asume que cualquier célula tumoral es mayor de 8  $\mu\text{m}$  lo que no es cierto.

Por otra parte, existen varios métodos comerciales que separan las CTC porque tienen menor densidad que otras células circulantes. Ficoll-Hypaque, OncoQuick<sup>®</sup> usa un gradiente de densidad para separar los distintos tipos celulares. Sin embargo, este método es poco sensible y específico (245, 260).

También son utilizadas técnicas inmunomagnéticas, que usan un marcaje con anticuerpos (ac) frente antígenos presentes en las CTC y, en algunos casos, una selección negativa con CD-45, un biomarcador ubicuo en leucocitos, para descartar que estas células hayan quedado atrapadas junto a las CTC. Esta técnica es la más específica. No obstante, su coste es elevado y, además, en la actualidad no se dispone de antígenos totalmente específicos de CTC (258, 261). Los antígenos más usados son los que marcan células epiteliales en general (EpCAM, BerEP4 y citoqueratinas) que pueden dar resultados falsos positivos, ya que pueden circular células epiteliales en sangre debido a enfermedades proliferativas epiteliales benignas, inflamación, trauma tisular e intervenciones quirúrgicas (262). También se usan marcadores específicos del órgano o tejido en el que se localiza el tumor primario (Mamaglobulina, PSA, CEA y HER-2), aunque en este caso el problema es el contrario: la presencia de falsos negativos porque estos antígenos no se expresen en todas las células tumorales. Las células se capturan en bolas magnéticas unidas a estos ac. La tabla 3 compara las distintas técnicas de enriquecimiento basados en estos mecanismos.

**Tabla 3:** comparación de los métodos de enriquecimiento de CTC.

<b>Método</b>	<b>Descrip.</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvs.</b>	<b>Refs.</b>
<b>Separación por tamaño</b>				
ISET™	Uso de filtros con un tamaño de poro de 8 $\mu\text{m}$	Barato Rápido Preserva la viabilidad celular	Pérdida de células rotas o de pequeño tamaño Baja sensibilidad Baja especificidad	(258, 259)

---

### Separación por densidad

OncoQuick®	Las CTC tienen una densidad menor de 1,077 g/ml	Barato Sólo requiere una centrifugación Preserva la viabilidad celular	Baja sensibilidad Pérdida de CTC Baja especificidad	(242, 245, 258-260)
------------	---	--	---	---------------------

### Separación inmunomagnética

MACS	Usa diferentes marcadores específicos de tumor	Mantiene la estructura celular Tiene múltiples ac	Baja especificidad Baja sensibilidad No está automatizado	(245, 258, 261)
RARE™	Combina un gradiente de densidad con selección	Mantiene la estructura celular El uso de	Baja especificidad Baja sensibilidad	(245, 263)

---

	negativa de células CD45+	gradiente de densidad aumenta la sensibilidad	No está automatizado	
AdnaTest®	Combinación de EpCAM y MUC1 y análisis por RT-PCR	Mantiene la estructura celular  Evaluación celular adicional por RT-PCR.	Baja especificidad  Baja sensibilidad  No está automatizado	
CellSearch®	Sistema semiautomatizado que combina la selección positiva con EpCAM con la selección negativa con CD45.	Mantiene la estructura celular  Aprobado por la FDA  Muchos estudios de validación.	Baja especificidad  Baja sensibilidad  Dificultades técnicas  Elevados costes	(264)
CTC-Chip	Array con acceso a EpCAM	Muy sensible  Detección de CTC de sangre completa	Sólo investigación	(265-267)

---

Mantiene  
viabilidad celular

Células  
disponibles para  
análisis genéticos

---

### 1.10.3.2.- Métodos de identificación.

Respecto a los métodos de identificación de CTCs, podemos agruparlos en tres grandes grupos. En primer lugar, se encuentran los métodos inmunocitoquímicos (ICQ), que permiten identificar proteínas derivadas del tumor y analizar las células seleccionadas en microscopios de fluorescencia con multifiltros (245). En segundo lugar, los métodos derivados de RT-PCR permiten analizar ácidos nucleicos de células tumorales. Finalmente, las técnicas que estudian el ADN genómico tumoral, como es el caso de la hibridación genómica comparada (CGH) y hibridación fluorescente in situ (FISH) (268).

Aunque son difícilmente comparables, las técnicas basadas en RT-PCR analizan la expresión de genes específicos de células epiteliales mediante la retrotranscripción y posterior amplificación del ARNm de sus células. La principal ventaja de este método es que es más sensible que los métodos ICQ y los genómicos. Su desventaja es que no preserva la morfología tisular. De hecho, es necesario lisar las células para aislar el ARN. Este método presenta dificultades a la hora de elegir el marcador y además presenta mayor riesgo de contaminación (245, 258, 269). Aunque es difícil la comparación entre estos métodos, Ring y cols. analizaron tres técnicas distintas (dos basadas en ICQ y una en RT-PCR) en pacientes con cáncer de colon metastático y encontraron que la mayor sensibilidad se obtenía empleando la técnica basada en RT-PCR (270), resultado refrendado en un segundo trabajo (271). A pesar de ello, las técnicas más usadas son las ICQ, porque preservan las células para posteriores análisis morfológicos o moleculares. En cualquier caso, cabe insistir en que actualmente no conocemos antígenos 100% específicos de CTCs, hecho que limita las técnicas empleadas.

Existen varias plataformas comerciales para la detección de CTC por medios ICQ (Tabla 4):

**CellSearch<sup>®</sup> Veridex.** Este procedimiento captura CTC en sangre periférica por captación inmunomagnética con ac antiEpCAM. Una vez ligadas se diferencian las células tumorales de los leucocitos tratando el producto con un panel de marcadores epiteliales (anti-CK8, anti-CK18 y antiCK19), un marcador de leucocitos (anti-CD45) y un marcador de ácidos nucleicos que sirve para marcar núcleos intactos (4,6-diamino-2-fenilindol; DAPI). Las muestras así marcadas se introducen en un detector automatizado que enumera CTC como células que expresan CK, no expresan CD45 y son teñidas con DAPI (272, 273). Este método es el único aprobado por la FDA para su uso clínico (264). Sin embargo aún existe controversia respecto a su punto de corte óptimo ya que está en función del contexto tumoral en el que trabajemos (274).

**CTC-Chip.** Consiste en la separación microfluidica de CTC por separación con ac anti-EpCAM. Esta técnica ha mostrado una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptables y es la única que usa la sangre completa sin ningún preprocesamiento de la muestra, además es capaz de mantener la viabilidad celular para posteriores análisis. La principal desventaja es que hay tumores o CTCs que no expresan EpCAM (275)

Hay otros métodos, como MACS<sup>®</sup>, ISET<sup>™</sup>, RARE<sup>™</sup> y FAST, que no están apoyados por ensayos clínicos que demuestren su validez, por lo que actualmente no existe el *gold standard* en cuanto a la detección de CTC (274).

**Tabla 4:** comparación entre técnicas de identificación de CTC.

<b>Método</b>	<b>Descripción.</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes.</b>	<b>Plataformas comerciales</b>	<b>Refs.</b>
<b>ICQ</b>	Usa ac monoclonales frente a antígenos expresados por las células tumorales	Barato	Baja especificidad	CellSearch®	(261, 263, 264, 276-278)
		Puede ser usado junto con técnicas de enriquecimiento	Baja sensibilidad		(266, 267)
			Sesgo por el operador	CTC-Chip	(279)
			Necesita mucha manipulación	FAST	
<b>RT-PCR</b>	Análisis de la expresión de genes específicos de células epiteliales tumorales.	Muy sensible Reproducibile Las muestras se pueden almacenar para futuros análisis Barato	No respeta la arquitectura tisular ARN muy lábil Necesidad de cebadores específicos Baja especificidad No permite análisis posteriores No automatizado		(269, 270)

---

<b>FISH</b>	<p>Análisis de alguna característica génica de células tumorales en ADN genómico</p> <p>No usado para detección si no para caracterización</p>	<p>Reproducible</p> <p>Respeto la arquitectura tisular</p>	<p>Técnica laboriosa muy</p> <p>Poco sensible</p> <p>No mantiene la viabilidad celular para futuros análisis.</p>	(279)
<b>CGH</b>	<p>Análisis de múltiples anomalías génicas a lo largo de todo el genoma celular</p> <p>No usado para detección si no para caracterización</p>	<p>Muy específico</p> <p>Reproducible</p>	<p>Muy caro</p> <p>Poco sensible</p> <p>No mantiene la viabilidad celular para futuros análisis.</p>	(280)

---

### 1.10.3.3- Detección de células tumorales circulantes en tumores diferentes al CaP.

La detección de CTC como factor diagnóstico o pronóstico se ha estudiado en múltiples tipos de cáncer con distinto éxito, siendo los principales los tumores mamarios y colorectales (281) y en menor medida también se han estudiado en otros cánceres como el de tiroides y el melanoma (282).

Un ámbito de gran desarrollo en el campo de las CTC es el cáncer de mama metastático, en el que se han usado varias técnicas para identificar y cuantificar el número de estas células en SP, siendo el procedimiento CellSearch<sup>®</sup> el que mejores resultados ha mostrado, obteniendo resultados positivos en un 26-49% de los casos (264, 278) con un punto de corte de 5 o más CTC por 7,5 ml de sangre periférica (283). En lo referente a los marcadores y dado que no existen marcadores específicos de tumor, se han usado algunos generales que se expresan en células epiteliales o en el órgano de origen del tumor. Uno de los del primer tipo es la *Citokeratina-19* (CK-19), que codifica para un filamento intermedio del citoesqueleto de células (284). En un trabajo de Stathopoulou y colaboradores se describe un método para cuantificar EMR en cáncer de mama mediante la detección por PCR cuantitativa de la expresión de *CK-19* en muestras de sangre del seguimiento de pacientes. Este método mostró una buena especificidad y sensibilidad usado en un grupo de pacientes con enfermedad metastática y otro de pacientes sanas, por lo que se consideró este método válido en la monitorización de EMR mediante CTC (285).

A pesar de lo prometedor de estos resultados, la utilidad clínica de la detección de CTC en cáncer de mama no metastático no ha sido establecida y los estudios radiográficos continúan siendo el *gold standard*. De hecho, la guía clínica para el uso de marcadores tumorales de la asociación americana de oncología clínica (ASCO) de 2007 no recomienda el uso de CTC para el diagnóstico o establecimiento del tratamiento en estas pacientes (286).

La detección de CTC con fines diagnósticos y pronósticos también se ha usado en cáncer colorrectal (CCR) (287) tanto temprano como metastático. En el primer caso se estudia su uso como herramienta para estadificar el cáncer al diagnóstico y por otro lado se analiza la expresión de *CK-20* y *CEA* por medio de qPCR. En el contexto del CCR metastático, aunque la detección de CTC ha probado su poder pronóstico, se necesitan estudios prospectivos para evaluar el beneficio de la modificación del tratamiento basada en el número de CTC presentes en SP de estos pacientes. Sin embargo este tipo de tumores presenta una peculiaridad, que es el bajo rendimiento de la prueba: sólo un 12% de los pacientes analizados con CCR metastáticos presentaron un perfil desfavorable de CTC usando la plataforma CellSearch<sup>®</sup>. Concretamente, en estos trabajos el punto de corte de detección se sitúa en 3 CTC por 7,5 ml de SP (288).

La detección de CTC como marcadores de EMR se ha estudiado también en sarcomas con resultados prometedores. A diferencia de lo que sucede con los otros tumores, algunos sarcomas expresan marcadores específicos como los genes de fusión que no se expresan en células normales, y por tanto la identificación de estos marcadores en sangre periférica constataría la presencia de CTC. En un trabajo de 1998 se estudiaron los transcritos de fusión *EWS-ERG* y *EWS-FLII* como marcadores pronósticos en sangre periférica de pacientes con sarcoma de Ewing. En este caso se emplean dos técnicas derivadas de RT-PCR, una *nested-PCR* que aumenta la sensibilidad de la detección, seguida de *southern blot* para detectar específicamente los transcritos amplificados. La presencia de los transcritos se correlacionó con progresión o bien con enfermedad estable, mientras que una negativización fue indicativo de remisión por tratamiento (289).

### **1.10.3.4- Detección de células tumorales circulantes en cáncer de próstata.**

Existen numerosos trabajos analizando el potencial pronóstico de la cuantificación de CTC, especialmente en pacientes con CaP resistente a castración (CPRC) (290-295). En estos estudios se han detectado CTC en un rango de 35-65% de pacientes con cáncer metastático o resistente a castración (CPRC). También se ha analizado la presencia de CTC en CaP temprano pero los autores no encontraron relación con los parámetros pronósticos clínicos y en esta población los resultados son bastante menos concluyentes ya que detecta la presencia de CTC en un 21% de pacientes y en un 20% de controles. Los autores justifican esto por el hecho de tomar un mayor volumen de sangre periférica (SP) en sujetos sanos (296). Tabla 5

**Tabla 5:** Resumen de los resultados obtenidos en trabajos que estudian la relación entre la presencia de CTC y el pronóstico en CaP

Estudio	Núm. de pacs	Marcador	% de pacientes con CTC	Resultados	Refs.
<b>CaP metastático</b>					
Moreno y cols. (2005) inmunoseparación magnética	37	Citoqueratina + CD 45 -	64%	≥ 5 CTC en 7,5 ml SP → SG <1 año < 5 CTC en 7,5 ml SP → >4 año	(293)
Shaffer y cols. (2007) inmunoseparación magnética	63	Citoqueratina + CD 45 -	65%	-	(295)
Olmos y cols. (2008) CellSearch®	119	Citoqueratina + CD 45 -	55,4%	≥ 5 CTC en 7,5 ml SP → SG <19,5 meses < 5 CTC en 7,5 ml SP → SG >30 meses	(294)
deBono y cols. (2008) CellSearch®	231	Citoqueratina + CD 45 -	57%	≥ 5 CTC en 7,5 ml SP → SG <11,5 meses < 5 CTC en 7,5 ml SP → SG >21,7 meses	(291)
Danila y cols. (2007) inmunoseparación magnética	120	Citoqueratina + CD 45 -	57%	Número de CTC predictor de supervivencia sin efecto umbral	(290)
Ghossein y cols. (1995). RT-PCR y <i>southern blot</i> .	107	PSA ARNm	30%	El número de CTC aumenta con el estadio del tumor	(292)

---

**Cáncer de próstata temprano**

---

Davis y cols. (2008) CellSearch <sup>®</sup>	97	Citoqueratina + CD 45 -	21% pacientes 20% controles	Sin correlación con factores pronóstico	(296)
---	----	----------------------------	--------------------------------	---	-------

---

### **1.10.4- Aplicación traslacional de la cuantificación de células tumorales circulantes en cáncer de próstata.**

Disponer de una técnica mínimamente invasiva para monitorizar el CaP es muy importante para el manejo clínico de la enfermedad, pero hasta ahora los marcadores para ello se caracterizaban por una baja sensibilidad y especificidad. En este sentido la presencia del gen *TMPRSS2-ERG* en CaP puede suplir estos fallos para que el uso de la detección de CTCs sea de gran ayuda en pacientes con CaP. De hecho, en algunos trabajos se empieza a usar *TMPRSS2-ERG* como marcador en CTCs con resultados prometedores (216, 225, 297). Por otro lado como se ha expuesto en el apartado anterior, actualmente la detección de biomarcadores en estas células requiere de técnicas costosas y de gran dificultad técnica, por lo que su implantación en la práctica clínica se hace complicada. En este sentido sería muy interesante el desarrollo de una técnica fiable, barata y sencilla para detectar el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en CTCs presentes en muestras de SP de pacientes con CaP.

Si bien la presencia del gen de fusión se da en aproximadamente la mitad de los casos de CaP, dentro de esta subpoblación la detección de *TMPRSS2-ERG* tiene una especificidad teórica del 100%, con lo que solucionaría muchos de los problemas ligados a la detección y cuantificación de CTCs enumerados en los apartados anteriores.

**2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### 2.1.- HIPÓTESIS.

En el CaP se han descrito gran número de alteraciones cromosómicas y genéticas en las que se ven implicados numerosos oncogenes y genes supresores de tumores. Estas alteraciones, sin duda, pueden afectar o definir tanto la iniciación como la progresión biológica del tumor así como su respuesta diferencial al tratamiento de deprivación hormonal, radioterapia y/o quimioterapia. No obstante, a día de hoy, no existe ningún biomarcador molecular con la sensibilidad y especificidad adecuadas para su uso en el manejo clínico del CaP.

Por otra parte, aproximadamente el 50% de los CaP expresan un gen de fusión *TMPRSS2-ERG* relacionado con la respuesta androgénica que constituye un marcador específico de CaP ya que no se detecta en próstata normal ni en lesiones benignas de próstata. La expresión de este gen de fusión acontece en un entorno celular característico que define diferentes tipos de CaP en función del estatus de expresión de este gen quimérico. Así pues, se pretende demostrar la utilidad de este biomarcador en el manejo clínico de pacientes tratados con prostatectomía radical. Y más concretamente en la detección del gen de fusión en células tumorales circulantes y por otro lado, profundizar en la necesaria caracterización del CaP mediante el establecimiento de un perfil de expresión génica. Aspectos, ambos, que pueden constituir una eficaz herramienta en el manejo clínico de la enfermedad.

### 2.2.- OBJETIVOS.

En relación a la hipótesis de esta tesis, se establecen los siguientes objetivos:

1. Estimar la frecuencia de la fusión génica *TMPRSS2-ERG* por RT-PCR e hibridación fluorescente in situ (FISH) en fijado e incluido en parafina (FFPE) de una población representativa de pacientes tratados con prostatectomía radical.
2. Establecer la correlación entre los dos procedimientos de detección del gen de fusión en FFPE.
3. Analizar la expresión de *TMPRSS2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *PCA3*, *HEPSIN*, *PAR-2*, *GSTP-1*, *AMACR*, *Cav-1*, *TPD52*, *Ki67* y *PTEN* y asociarlos en función del estatus del gen de fusión en FFPE.
4. Establecer un patrón de expresión de genes característico del CaP.
5. Correlacionar los datos moleculares sobre la fusión con los parámetros clínico-patológicos usados en el manejo clínico del paciente con CaP tratado con prostatectomía radical.
6. Analizar el significado pronóstico, en cuanto a intervalo libre de progresión bioquímica y clínica, de estos hallazgos moleculares
7. Establecer un procedimiento de identificación y cuantificación de células tumorales circulantes empleando la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en SP como marcador en una serie prospectiva de pacientes con CaP tratados con prostatectomía radical.
8. Identificar el status del gen *TMPRSS2-ERG* en las muestras de SP del seguimiento de los pacientes operados por CaP a fin monitorizar la enfermedad mínima residual.
9. Correlacionar los resultados obtenidos en SP con con los parámetros clínico-patológicos usados en el manejo clínico del CaP y con la progresión bioquímica durante el seguimiento.

# 3 MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. PACIENTES.

En el presente estudio, se han analizado 466 muestras fijadas en formol e incluidas en parafina correspondientes a PTR realizadas en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO). De entre las cuales, 314 componen una serie retrospectiva comprendida en el período entre Julio de 1996 y Mayo de 2004, mientras que las 152 muestras restantes conforman una serie prospectiva correspondiendo al intervalo entre Julio de 2007 y Noviembre de 2008. De esta última serie también se analizaron 377 muestras de 14 ml de SP de correspondientes cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Estas muestras corresponden a las visitas de seguimiento de los pacientes. En la figura 13 se muestra el esquema de distribución de las muestras de cada una de las series, así como las pruebas realizadas. Para las 466 muestras de material FFPE, se elaboraron 20 matrices tisulares a partir de las cuales se realizaron cortes seriados de 2  $\mu\text{m}$  para las técnicas de FISH e IHQ, y por otro lado se hicieron 3 cortes de 20  $\mu\text{m}$  en los bloques para la extracción de ARNm.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la FIVO y con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes.

Todos los pacientes incluidos en este estudio han sido tratados exclusivamente, con PTR, excluyéndose del mismo los que hayan recibido quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia. Todos los casos de la serie retrospectiva fueron operados con cirugía abierta acompañada en 288 casos (21,7%) de linfadenectomía ilio-obturatriz. La serie prospectiva es más heterogénea, 82 de los casos (53,9%) corresponden a una cirugía laparoscópica, mientras que los 68 casos restantes (44,7%) fueron abiertas. 42 (27,6%) pacientes fueron, además linfadenectomizados de los cuales 27 procedimientos fueron ilio-obturadores y 15 ampliados. Histológicamente, todas las muestras incluidas en este trabajo son adenocarcinomas

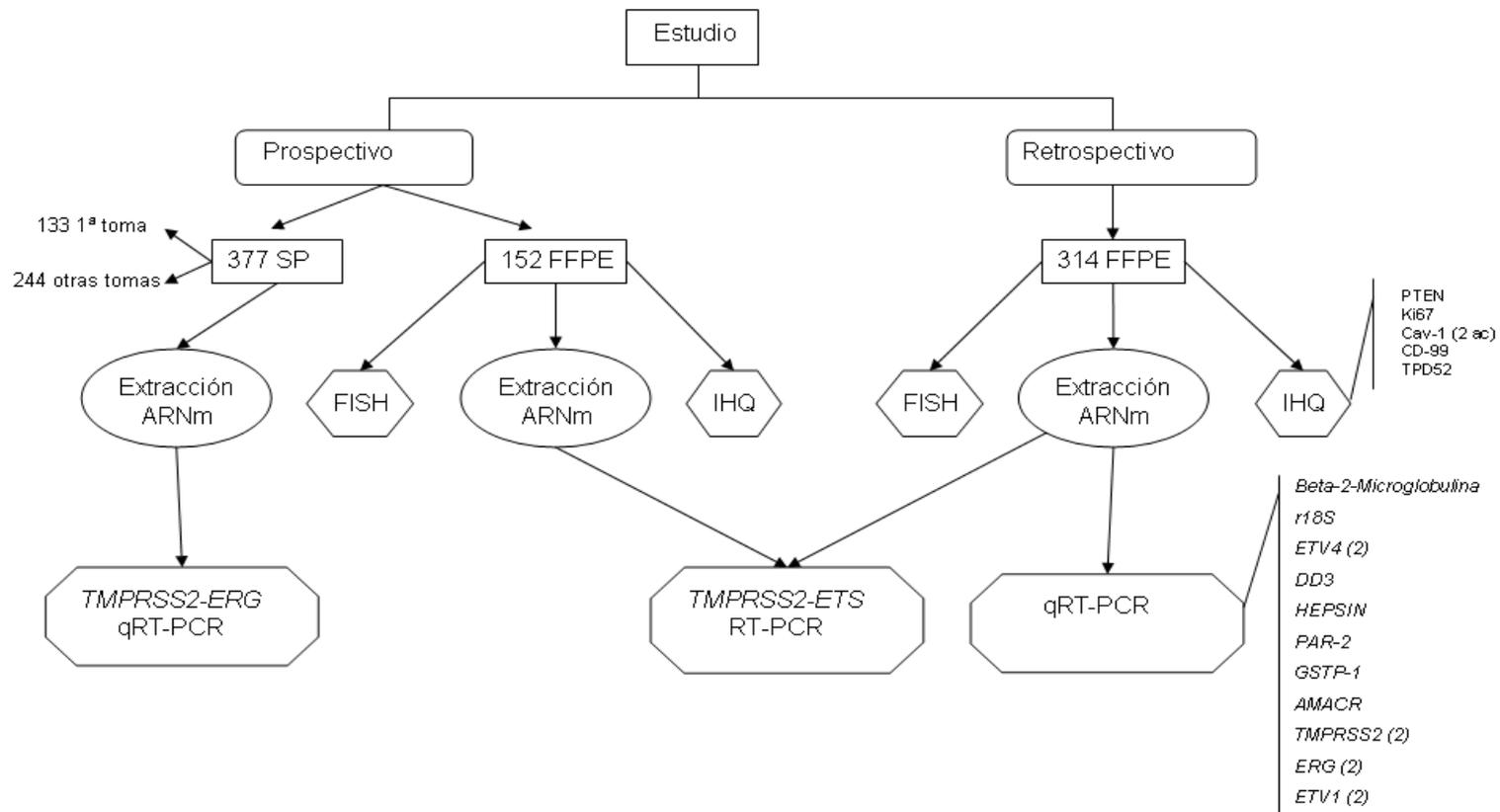
En la siguiente tabla se describen las características de la serie analizada:

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

**Tabla 6:** principales características de los pacientes incluidos en cada una de las series.

	<b>Serie retrospectiva</b>	<b>Serie prospectiva</b>
<b>Edad (años) mediana (rango)</b>	67,4 (49-84)	62 (46-72)
<b>Progresión bioquímica</b>	128 (40,8%)	22 (14,5%)
<b>ILPB (meses) mediana (rango)</b>	67,85 (0,53-159,17)	18,95 (0,5-43,1)
<b>Progresión clínica</b>	74 (23,6%)	7 (4,6%)
<b>ILP (meses) mediana (rango)</b>	76,83 (2,07-76,83)	20,26 (0,6-43,1)
<b>Seguimiento (meses)</b>	83,85 (2,07-159,8)	20,83 (1,23-43,10)
<b>Exitus cáncer específicos</b>	8	0
<b>Exitus por otras causas</b>	20	0



**Figura 13:** Esquema de las muestras analizadas y los procedimientos seguidos en el presente estudio..

### 3.2- PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS ESTUDIADOS.

Los hallazgos biológicos de esta tesis fueron correlacionados con una serie de características clínicas y patológicas de los pacientes incluidos en el estudio. Los datos fueron obtenidos y revisados de las correspondientes historias clínicas de los pacientes e introducidos en una base de datos específica. Posteriormente estos datos fueron categorizados para su procesamiento estadístico del siguiente modo:

1. Niveles de PSA inicial
  - 0-10 ng/ml
  - 10-20 ng/ml
  - >20 ng/ml
  
2. Estadío clínico (cT)
  - ≤cT2b
  - ≥cT3a
  
3. Estadío patológico (pT)
  - ≤pT2b (organoconfinado)
  - ≥pT3a (extraprostático)
  
4. *Score* de Gleason en tejido prostatectomizado.
  - 2-6
  - 7
  - 8-10
  
5. Infiltración perineural.
  - No consta
  - Presencia
  - Ausencia
  
6. Afectación ganglionar (N).
  - No consta
  - N0 (negativos)
  - ≥N1 (positivos)
  
7. Presencia de PIN.
  - Ausencia

Presencia (detectado en biopsia o en tejido extirpado en prostatectomía).

9. PSA nadir
  - < 0,2 ng/ml
  - ≥ 0,2 ng/ml

### **3.3. REVISIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS.**

Las piezas de PTR analizadas en este trabajo han sido fijadas en formol, incluidas en bloques de parafina y almacenadas en el Servicio de Anatomía Patológica (SAP) de la FIVO. Se realizó una tinción hematoxilina-eosina de cada corte con fines diagnósticos. Todas las muestras incluidas fueron revisadas por un patólogo especializado en Uro-Patología a fin de confirmar el *score* de Gleason y valorar la proporción de células tumorales en cada corte de la biopsia, con el objeto de seleccionar el área con cantidad suficiente de células tumorales para garantizar una adecuada extracción de ARNm y una mayor representatividad del tumor.

### **3.4. AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN FORMOL E INCLUIDAS EN PARAFINA.**

Con el objetivo de realizar la RT-PCR con garantías de éxito es necesario contar con un ARNm de la mayor calidad e integridad posible.

Para la extracción de ARN se emplea el Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). Este método consiste básicamente en la desparafinación con xilol y etanol, una digestión con proteinasa K, un paso de digestión con ADNasas y una serie de lavados con un eluido final en agua. Todo el proceso se lleva a cabo reteniendo el ARN en un filtro de fibra de vidrio incluido en una columna. A continuación se detalla paso por paso el protocolo empleado:

1. Se colocan 3 secciones de 20 µm en un tubo Eppendorf estéril.
2. Añadimos 1000µl de xilol. Se vortea vigorosamente e incuba 3 min. a 50° C.
3. A continuación, la muestra se centrifuga a 14500 rpm 2 min a temperatura ambiente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

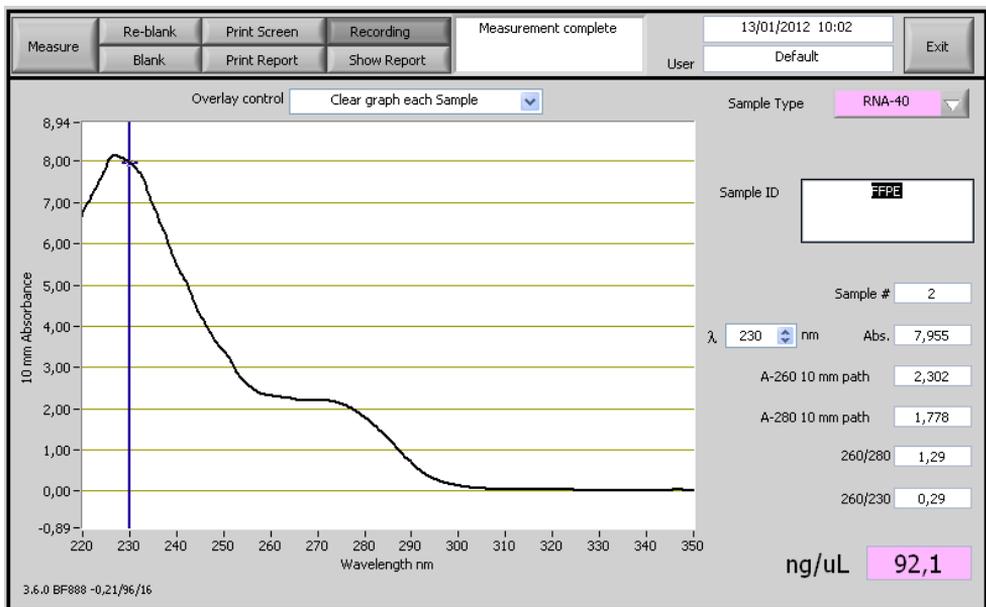
---

4. El sobrenadante se desecha con pipeta sin tocar el sedimento.
5. Se repiten los pasos 2-4 una vez más.
6. Se añaden 1000  $\mu\text{l}$  de etanol 100% para eliminar el xilol. Se vortea la muestra brevemente a máxima velocidad.
7. La muestra se centrifuga a máxima velocidad 2 min y a temperatura ambiente.
8. Con la pipeta, se desecha el etanol.
9. Se repiten los pasos 6-8 una vez más.
10. Una vez eliminado el etanol, se coloca el tubo Eppendorf con la tapa abierta en una estufa a 37°C a fin de conseguir la completa evaporación del etanol.
11. A continuación, el sedimento se resuspende en 400  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis.
12. Se añaden 4  $\mu\text{l}$  de Proteasa a la solución de lisis. Se vortea y se incuba a 50°C durante 3 h vorteaando ocasionalmente.
13. Tras la incubación, se añaden 480  $\mu\text{l}$  de Isolation additive y se vuelve a vortear.
14. A continuación se añaden 1100  $\mu\text{l}$  de etanol (100%) y se mezcla bien con la pipeta.
15. Se monta la columna de extracción en un tubo de recogida suministrado en el kit y se pasan 700  $\mu\text{l}$  de la mezcla, mediante centrifugación 1 min. a 10000 rpm desechando el líquido que queda en el tubo.
16. Se repite el paso 15 hasta haber pasado toda la solución.
17. El filtro de la columna se lava con 700  $\mu\text{l}$  de la solución Wash 2/3. y centrifugando a 10000 rpm durante 30 seg.
18. Tras la centrifugación se descarta el líquido.
19. Se repiten los pasos 17 y 18 pero esta vez con 500  $\mu\text{l}$  de solución wash 2/3.
20. Se efectúa un spin de 30 seg. para acabar de secar la columna.
21. Se prepara el Mix para la digestión enzimática con ADNasa:

- i. 6  $\mu$ l de 10x Dnase buffer.
  - ii. 4 $\mu$ l Dnase .
  - iii. 50 $\mu$ l agua libre de ADNAsas.
22. Se añaden los 60  $\mu$ l del mix a la columna y se incuba 30 min. a temperatura ambiente.
23. Se añaden 700  $\mu$ l de la solución Wash 1 y se incuba durante 1 minuto a temperatura ambiente.
24. Se centrifuga 30 seg. a 10000 rpm y se desecha el líquido.
25. A continuación se repiten los pasos 17,18 y 19.
26. La columna se pasa a un tubo colector limpio y se añaden 30  $\mu$ l de agua libre de Rnsas a temperatura ambiente.
27. Se incuban 10 min. a temperatura ambiente.
28. A continuación se centrifuga. a 14500 rpm durante 1 minuto.
29. Se repite la elución con otros 30  $\mu$ l (que harían un volumen total de elución de 60  $\mu$ l).
30. Para finalizar, se hace una electroforesis con 5  $\mu$ l del ARN obtenido en un gel de agarosa al 1% 90V, 30 min., con el fin de chequear su integridad.

### 3.4.1.- Cuantificación de la concentración de ARN mediante espectrofotometría

La concentración del ARN se midió en un espectrofotómetro Nanodrop 1000, mediante la absorción de luz UV con una longitud de onda de 260 nm. La contaminación con proteínas se mide con el ratio de absorbancias a 260/280 nm, considerándose adecuado un ratio de 1,8 a 2. No obstante, debido a la fragmentación que sufre el ARN durante la fijación con formaldehído e inclusión en parafina, esta medida espectrofotométrica es una estimación. En la figura 14 se observa la cuantificación de una muestra FFPE con el ND-1000.



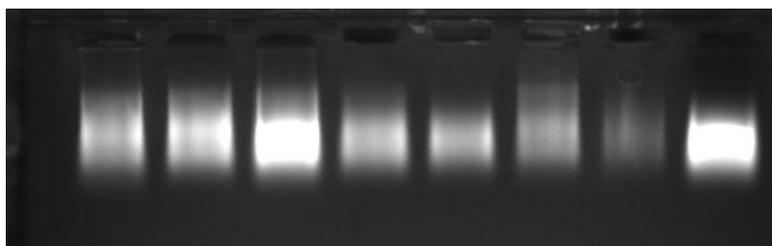
**Figura 14:** Curva de absorbancia de una muestra de ADN obtenida de material FFPE en el ND-1000. Se pueden apreciar, además de la cuantificación los ratios de absorbancia.

### 3.4.2.- Testado de la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ARN se mide usando la técnica de electroforesis basada en el desplazamiento de los ácidos nucleicos (cargados negativamente debido a sus grupos fosfato) por una malla de agarosa polimerizada. El tamaño de poro viene determinado por la concentración de agarosa en polvo añadida a un medio de sales.

A continuación se somete a la muestra a una carga eléctrica con lo que el ARN migrará hacia el cátodo en condiciones de pH neutro. Figura 15

Para la elaboración del gel de agarosa al 1% se pesa la cantidad de agarosa necesaria en la balanza de precisión y se introduce en un erlenmeyer. A continuación se añade el volumen preciso (según el molde usado) de tampón TBE 0.5X y se calienta en microondas hasta que la agarosa se funde. Se añaden los peines en el molde y se vierte la solución de agarosa y tampón. Acto seguido se añade una gota de bromuro de etidio y se deja enfriar y solidificar antes de su uso.



**Figura 15:** Resultado de la electroforesis en un gel de agarosa al 1% obtenido al correr 5  $\mu$ l de ARN obtenido de muestras FFPE. Debido a la fragmentación del ARN no se observan las dos bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

### **3.5. AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS OBTENIDAS DE SANGRE PERIFÉRICA.**

#### **3.5.1.- Obtención de la fracción de células mononucleadas en sangre periférica.**

La obtención de la fracción de células mononucleadas de SP se lleva a cabo mediante un gradiente de densidad siguiendo el protocolo que a continuación se detalla:

1. La SP (recogida en tubos de EDTA o Heparina) se diluye en suero fisiológico (SF) hasta un volumen de 10 ml.
2. A continuación, la sangre diluida se trasvasa, con una pipeta de plástico, a un tubo (CIP, Poseidon) de 14 ml que contiene 4 ml de Ficoll-Hystopaque 1077 (Sigma). El trasvase se hace con cuidado para no romper la interfase.

3. Se centrifuga a 1200 rpm durante 20 min en una centrifuga Eppendorf (5417R) enfriada a 4°C.
4. Las células monocleadas presentes en la interfase y se recogen con una pipeta Pasteur de plástico y se depositan en un tubo de 14 ml limpio.
5. Después se centrifuga a 1200 rpm durante 5 min.
6. El sobrenadante se decanta y el pellet se lava con 10 ml de SF.
7. Se resuspenden las células con una pipeta Pasteur.
8. Las células resuspendidas se vuelven a centrifugar a 1200 rpm durante 5 min.
9. Tras desechar el sobrenadante, el pellet celular se homogeneiza con 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen) con ayuda de una jeringuilla de insulina de 1 ml.
10. La suspensión se almacena a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

### **3.5.2.- Extracción de ARN a partir de la fracción de células mononucleadas de sangre periférica.**

La extracción del ARN de las células resuspendidas en trizol se lleva a cabo con el kit PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). Este método de aislamiento se basa en la lisis del sedimento celular en presencia de isocianato de guanidinio, primero se añade cloroformo que tras una centrifugación formará una solución bifásica consistente en una fase orgánica (rosa) y otra acuosa (transparente) que contiene los ácidos nucleicos (298). Después de añadir etanol a esta fase, se añade la mezcla a una columna, quedando retenido el ARN en una membrana de silicio incluida. Las impurezas se eliminan lavando con dos tampones incluidos en el kit (299). Debido a que en la columna quedará retenida cierta cantidad de ADN genómico, es opcional realizar una digestión con ADNasas. A la hora de aplicar este paso cabe considerar que al llevarse a cabo a alta temperatura, restará algo de rendimiento al proceso de extracción. A continuación se detalla el protocolo que se ha llevado a cabo:

1. El lisado se incuba 5 min a temperatura ambiente o hasta que se descongele si ha sido almacenado hasta este momento.

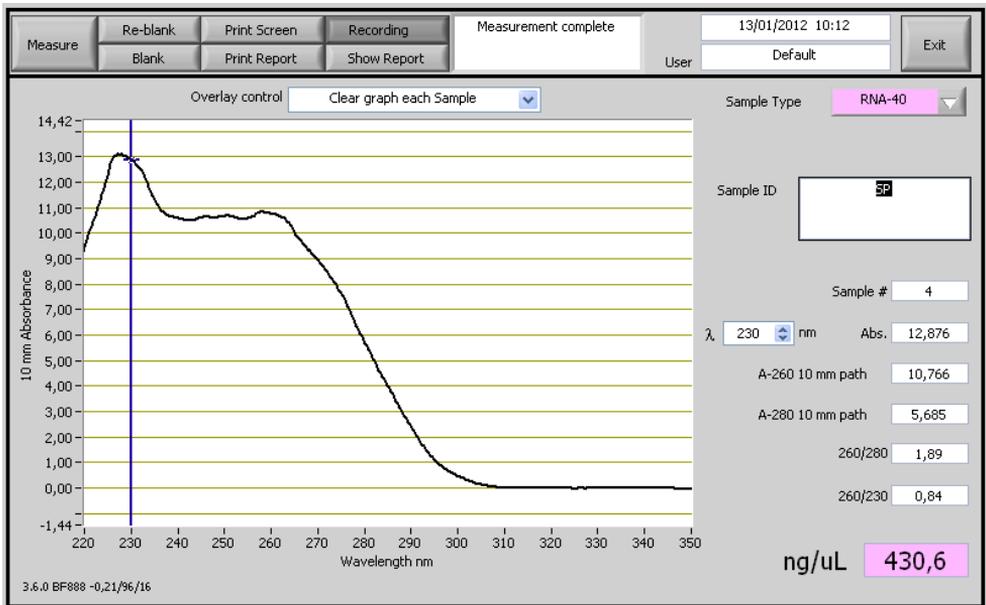
2. Se añaden 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de Trizol.
3. Los tubos se agitan vigorosamente a mano (no vortear) y se incuban 15 min. a temperatura ambiente.
4. A continuación, se centrifuga 15 minutos, a 12.000xg a 4°C.
5. Tras la centrifugación la fase acuosa transparente se transfiere a un tubo limpio.
6. Se añade un volumen de etanol al 70% a -20°C y se vortea dispersando cualquier precipitado visible tras añadir el etanol.
7. Se transfieren 700 $\mu$ l de la muestra a una columna de extracción y se centrifuga a 12.000 xg. 15 segundos a temperatura ambiente. El líquido que queda en el fondo del tubo se descarta.
8. Se repite el paso 7 hasta pasar todo el contenido de la columna.
9. Se añaden 700  $\mu$ l de la solución Wash Buffer I a la columna y se centrifuga a 12.000xg 15 segundos a temperatura ambiente. Se descarta el tubo colector.
10. La columna se pone en un tubo de lavado de ARN.
11. Se añaden 500  $\mu$ l de la solución Wash Buffer II a la columna y se centrifuga 15 segundos a 12.000xg a temperatura ambiente. Se descarta el líquido que queda en el fondo del tubo.
12. A continuación, se centrifuga la columna vacía a 12.000xg 1 minuto a Temperatura ambiente para eliminar el buffer remanente.
13. Se repiten los pasos 11-13. Descartamos el tubo de lavado.
14. La columna se pone en un RNA Recovery Tube limpio.
15. Se añaden 30  $\mu$ l de Agua libre de RNAsas al centro de la columna y se deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
16. Posteriormente la columna se centrifuga 3 minutos a máxima velocidad.
17. Repetimos los pasos 15-16.
18. En caso de llevar a cabo una digestión con ADNAsas, se preparará la siguiente solución:

## MATERIAL Y MÉTODOS

1  $\mu$ l de AADNasas 10x  
8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O- DEPC  
1  $\mu$ l de AADNasa (1 unidad /  $\mu$ l)

19. Se añaden a cada tubo 10  $\mu$ l del mix y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
20. Finalmente, se añade 1  $\mu$ l de EDTA 25 mM y se incuba 10 minutos a 60° C para inactivar las ADNasas.

La concentración de ARN obtenido se mide en un espectrofotómetro Nanodrop 1000, el procedimiento usado es el mismo detallado en el apartado 4.4.1. En este caso las concentraciones obtenidas por este método serán más exactas, ya que, no se da una fragmentación significativa del ARN. En la figura 16 se puede observar la cuantificación del ARN obtenido de SP con el ND-1000.

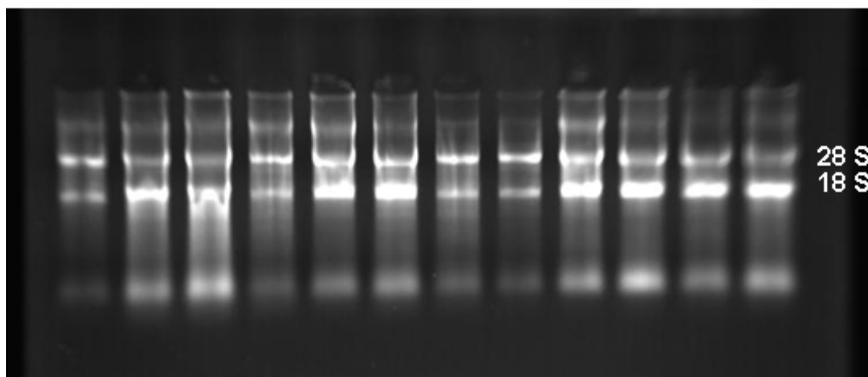


**Figura 16:** Curva de absorbancia de una muestra de ARN obtenida de la fracción de células mononucleadas de SP obtenidas en el espectrofotómetro ND-1000. En la figura puede apreciarse el ratio 260/280.

Como control de calidad adicional, se puede testar la integridad del ARN con una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (ver apartado 4.4.2). Se cargan en el gel 5  $\mu$ l de la elución del ARN y se aplica un campo

eléctrico de 90 V durante 15 minutos, a continuación se visualiza el gel en un transiluminador UV con una cámara fotográfica acoplada.

En un ARN bien conservado se deben diferenciar claramente dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S (Figura 17).



**Figura 17:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de ARN obtenido a partir de SP. Pueden apreciarse claramente las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

### 3.6. CULTIVO CELULAR.

La línea celular VCaP, que porta la fusión del exón 1 de *TMPRSS2* con el 4 de *ERG* (T1E4), se cultivó para obtener un control positivo para la PCR cualitativa, así como para realizar la curva de calibración para la cuantificación absoluta por qPCR como se detallará más adelante. Esta línea celular proviene de una metástasis vertebral obtenida como parte del programa de autopsias rápidas de la Universidad de Michigan y presenta muchas de las características clínicas de un adenocarcinoma prostático como la expresión de PSA, fosfatasa ácida prostática (PAP) y receptor de andrógenos (AR) (300). Por otro lado esta línea celular presenta una variación de número de copias consistente en una ganancia en 21q, que es una característica genómica rara en carcinomas prostáticos (231). Fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA).

Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con una concentración 4 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glucosa y 1,5 g/L de bicarbonato sódico suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 50 unidades/ml

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

de penicilina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomicina (Gibco BRL, Grand Island, NY).

Los cultivos se mantuvieron en un incubador con atmósfera controlada (5% de  $\text{CO}_2$  en aire y humedad controlada) durante tres días. Posteriormente, como las células crecen adheridas al fondo del frasco, en monocapa, se procedió a la obtención de una suspensión celular para llevar a cabo los experimentos. Para obtener el número necesario de células para los experimentos se realizaron subcultivos siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se elimina el medio de cultivo del frasco y las células se dejan 5 minutos con PBS estéril a temperatura ambiente para eliminar los restos de suero.
2. Se trata de 10 a 20 minutos con 3ml de solución Tripsina-EDTA (Gibco BRL). Controlando en el microscopio de contraste de fase hasta que las células se despeguen.
3. Se añade y se lava, con el doble de volumen (6ml) de medio completo para neutralizar la tripsina y se transfiere a un tubo Falcon de 7 ml.
4. Se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm.
5. Se repite el lavado con medio completo 2 veces.
6. Finalmente, las células se recogen con medio completo y se reparten en dos frascos que se dejan incubar en las condiciones indicadas anteriormente.
7. Las células se doblan cada 3 días.

Alternativamente, las células se pueden congelar en nitrógeno líquido para su posterior uso.

### 3.6.1. Crioconservación de células cultivadas.

Cuando los subcultivos alcanzaron la semiconfluencia del 80% aproximadamente, se procedió a la congelación de las muestras de un frasco para conservarlas viables para estudios posteriores. Para ello, se procedió como en el caso de la realización de subcultivos y cuando se obtuvo el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo completo (medio de Eagle con modificación de Dulbecco) con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). Las células tratadas de este modo y conservadas en un tanque de nitrógeno líquido (-195,8°C) en tubos específicos pueden conservar su viabilidad de forma prácticamente indefinida.

### 3.7. TRANSCRIPCIÓN INVERSA.

La transcripción inversa o retrotranscripción (RT) es un proceso que genera una cadena de ADNc de simple cadena a partir de ARNm, de cadena sencilla, que actúa como secuencia 'molde' para una polimerasa de origen retroviral denominada transcriptasa inversa.

En el caso particular que nos ocupa, lo que pretendemos es amplificar un transcrito resultado de un reordenamiento cromosómico que ha dado lugar a la fusión de dos genes. Este reordenamiento se suele producir en regiones intrónicas que no suelen afectar la pauta de lectura de los exones ya que estas regiones son eliminadas en la molécula de ARNm maduro gracias a un proceso denominado de *splicing*. Por tanto, en una extracción de ARN total lo que tendremos serán moléculas de ARNm maduros, algunos de los cuales será el resultado de un gen de fusión.

Para la identificación de los productos de los genes de fusión, adoptamos una técnica de RT-PCR en dos pasos. En el primero, seguimos una estrategia basada en primers hexámeros al azar, que servirán de cebadores para la transcriptasa reversa para producir una librería de ADNc. Posteriormente seleccionaremos el ADNc proveniente de nuestro transcrito diana llevando a cabo la PCR cualitativa con primers específicos situados en regiones exónicas de los genes que intervienen en el gen quimérico. En la síntesis del ADNc se usa el kit High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems®). Siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial:

1.- En la tabla 7 se detallan todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

2.- La mezcla de reacción se prepara multiplicando el volumen de cada reacción por el número de casos que se vayan a retrotranscribir más un 10% adicional con el objeto de compensar los errores de pipeteo.

**Tabla 7:** Composición de la mezcla de reacción de la RT.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l) por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>RT Buffer</b>	2,0	10X
<b>dNTP Mix (100 mM)</b>	0,8	25X
<b>RT random primers</b>	2,0	10X
<b>Multiscribe™ Reverse Transcriptase (20 U/<math>\square</math>l)</b>	1,0	20 U
<b>Inhibidor de RNasas (50 U/<math>\mu</math>l)</b>	1,0	50 U
<b>Agua libre de RNasas</b>	13,2	
<b>ARN</b>	200 ng	
<b>Total por reacción</b>	20	

3.- La mezcla de reacción se vortea y centrifuga brevemente.

4.- Se añade el volumen de reacción correspondiente a cada tubo de 200  $\mu$ l.

5.- Finalmente, se añade el volumen adecuado de ARN (equivalente a 200 ng de ARN total) y se rotulan los tubos

6. Los tubos de reacción se colocan en el termociclador (Applied Biosystems modelos 2720, 9700 y Veriti).

	<b>Paso 1</b>	<b>Paso 2</b>	<b>Paso 3</b>	<b>Paso 4</b>
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tiempo</b>	10 min	120 min	5 min	∞

7.-El ADNc obtenido se almacena a -20°C hasta el momento de su uso.

### 3.8. PCR CUALITATIVA.

Nuestro método se basa en diseñar productos de PCR de pequeño tamaño para analizar con mayores garantías de éxito el ARN que está degradado por el proceso de fijación en formol e inclusión en parafina. Debido a la corta longitud del amplicón, estas reacciones son muy susceptibles de contaminación, por lo que es necesario extremar las precauciones durante la preparación de la PCR. En este sentido, todas las reacciones se realizaron en campana con lámpara de rayos ultravioleta, y al acabar la PCR se deja la superficie de trabajo iluminada con esta radiación durante 15 minutos. Asimismo se cuidó de usar guantes limpios, cambiándolos cada vez que fue necesario tocar algo del exterior de la campana.

En las tablas 8 y 9 se especifican las condiciones de reacción y amplificación respectivamente:

**Tabla 8:** Volúmenes de reactivos para llevar a cabo la PCR convencional de detección de los transcritos de fusión

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l) por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Master Mix Fast (Applied Biosystems)</b>	5,0	2X
<b>Primer F (15 <math>\mu</math>M)</b>	0,25	0,375 $\mu$ M
<b>Primer R (15 <math>\mu</math>M)</b>	0,25	0,375 $\mu$ M
<b>cDNA (200 ng de ARN total)</b>	2,0	
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	2,5	
<b>Volumen final</b>	10,0	

**Tabla 9:** Condiciones de la PCR cualitativa para amplificar el transcrito de las fusiones

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 min	1
95°C	1 min	40
55°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1

Para realizar esta PCR se emplearon los termocicladores 2720, 9700 y Veriti de Applied Biosystems

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar los transcritos de todas las fusiones. Tabla 10:

**Tabla 10:** primers usados en la PCR cualitativa

<b>Nombre del cebador</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Nombre del amplicón</b>	<b>Tamaño del amplicón</b>
TMPRSS2 F	TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG	TMPRSS2-ERGe4	126 pb
ERG R (exón 4)	CAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCT AC		
ERG 5B R (exón 5)	TCATCCCAACGGTGTCTGGGC TG	TMPRSS2-ERGe5	146 pb
ENF1003	TGGAGATAACACTCTAAGCAT AACTAAAGGT	ABL	123 pb
ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA		

### **3.8.1. Purificación de los productos de PCR.**

Una vez acabada la PCR cualitativa es necesario purificar los productos obtenidos para llevar a cabo la secuenciación con garantías de éxito. Esta purificación se lleva a cabo con placas de filtración por vacío de 96 pocillos multiscreen PCR96 filter Millipore (ver apartado 3.9), pipeteando el contenido de cada tubo de la PCR en un pocillo de la placa se le añade agua de PCR hasta un volumen de 100 µl. A continuación se enciende la bomba de vacío, cuando ha filtrado todo el producto de PCR eluido se añaden 30 µl de agua miliQ a cada pocillo usado y se incuba 20 minutos, después se recoge el agua con el producto de PCR eluido y purificado.

El siguiente paso es la semicuantificación del producto purificado por la observación de bandas en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (ver sección 3.4.2).

### 3.9.- SECUENCIACIÓN.

Una vez determinada la dilución necesaria por visualización en gel de agarosa (ver apartado 3.8.1) se procede a la reacción de secuenciación. Para la que hay que preparar el mix detallado en la tabla 11 y usar las condiciones de PCR en la tabla 12.

**Tabla 11:** Volúmenes de reactivos para llevar a cabo la PCR convencional de detección de los transcritos de fusión

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl) por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>AB buffer</b>	1,5	6,6X
<b>Big dye</b>	0,5	20X
<b>Primer F/R (3,2 µM)</b>	1	0,32 µM
<b>Producto de PCR diluido</b>	2,0	
<b>Agua</b>	5	
<b>Volumen final</b>	10,0	

**Tabla 12:** Condiciones de la PCR de secuenciación (programa big dye fast).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	1 min	1
96°C	10 seg	25
50°C	5 seg	
60°C	75 seg	
4°C	∞	

Después de terminar la reacción es necesario volver a purificar el producto. Esto se lleva a cabo con placas de filtración por vacío (Montage™ SEQ96. Millipore) a fin de eliminar el exceso de primers y buffers en la reacción. Las placas se adhieren a un manifold especial conectado a una bomba de vacío, se añaden uno de los productos por pocillo y se filtran por vacío, luego se hacen dos lavados con buffer específico y posteriormente se eluyen los productos en agua.

Las muestras ya se pueden introducir en el secuenciador 3130 xl (ABI) usando un capilar de 36 cm y usando un polímero POP7. El análisis de los electroferogramas obtenidos se lleva a cabo con el software Analysis sequencing v 5.2 de ABI

El resultado obtenido se alineó frente a las siguientes secuencias consenso:

*TMPRSS21-ERG4:*

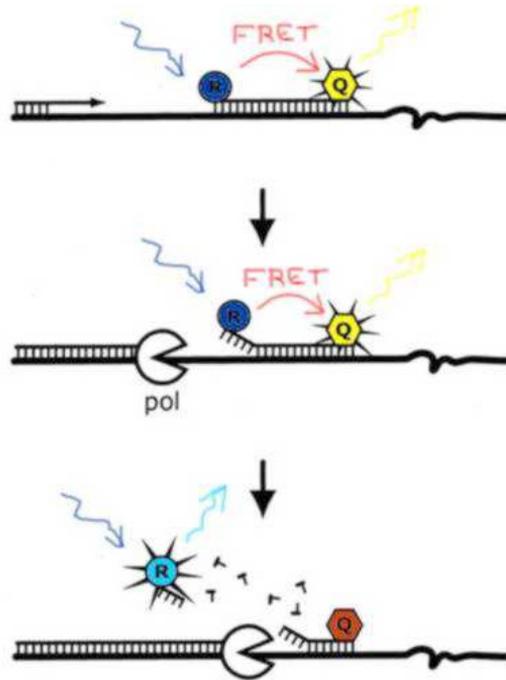
```
TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGGCG  
AGGGGCGGGGAGCGCCGCTGGAGCGCGGCAGGAAGCCTTATC  
AGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC
```

*TMPRSS21-ERG5:*

TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGGCG  
AGGGGCGGGGAGCGCCCGCTGGAGCGCGGCAGGAACTCTCCTG  
ATGAATGCAGTGTGGCCAAAGGCGGGAAGATGGTGGGCAGCCC  
AGACACCGTTGGGATGA

### 3.10. PCR CUANTITATIVA.

Para el estudio de los niveles de expresión de los genes *TMPRSS2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *AMACR*, *DD3*, *HEPSIN*, *PAR-2*, *GSTP-1* y *Cav-1*, se ha procedido a realizar una PCR cuantitativa en un termociclador ABI 7500 fast (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) que es capaz de hacer lecturas de fluorescencia en cada ciclo de la amplificación. La característica de esta amplificación se basa en que en la reacción, además de los primers específicos, se añaden unas sondas diseñadas para hibridar en el centro de la secuencia amplificada (sondas TaqMan) y una polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa. Las sondas TaqMan se caracterizan por contener una molécula fluorófora y una atenuadora de fluorescencia (*quencher*) que actúan por transferencia electrónica de la resonancia (FRET), de forma que no emite fluorescencia. En cada ciclo de PCR las sondas se hibridan a las monohebras de ADN que se han formado en ciclos anteriores y que representan un molde para la nueva síntesis de ADN. La polimerasa incorpora nucleótidos en dirección 3'-5' hasta que llega al punto en que se encuentra con la sonda TaqMan hibridada en la dirección 5'-3' (sentido complementario). En este momento activa su función 5'-3' exonucleasa que degrada la sonda, separando fluoróforo y atenuador, emitiéndose así fluorescencia. La monitorización de este cambio de fluorescencia permite inferir la cantidad inicial de ADN en nuestra muestra. Figura 18.



**Figura 18:** mecanismo de actuación de las sondas TaqMan usadas para la detección de secuencias génicas en la PCR en tiempo real. Imagen tomada de <http://www.up.poznan.pl/~mschmidt/images/TaqMan.jpg>

Además de las precauciones generales adoptadas para la PCR cualitativa, hay otra adicional para la reacción cuantitativa: los productos de PCR además de cortos deben ser homogéneos para garantizar una mayor reproducibilidad y comparación fiable de los resultados (301).

Con esta técnica llevamos a cabo dos tipos de cuantificaciones en función de la aplicación que deseamos obtener:

1. Para estudiar la expresión de genes implicados en la patogénesis del CaP llevamos a cabo una cuantificación relativa
2. . Para cuantificar la enfermedad mínima residual (identificación de transcritos *TMPRSS2-ERG* en sangre periférica) usamos el método de cuantificación absoluta.

### 3.10.1. Cuantificación relativa por RT-PCR cuantitativa.

Para analizar los niveles de expresión de genes implicado en la patobiología del CaP y en la serie retrospectiva, empleamos la modalidad de qPCR relativa. En ésta se cuantifica la expresión relativa de nuestra muestra con respecto a una población control (tejido prostático normal). Esta transformación se lleva a cabo con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Es un modelo que no requiere el cálculo de las eficiencias de la reacción, ya que asume que las sondas TaqMan ya están perfectamente testadas, por lo que la eficiencia es del 100% en la cuantificación del gen problema y del gen control (302). Este método se aplica para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica estudiando la relación entre los valores del ciclo umbral (Ct) de la muestra y los valores Ct del control.

En las tablas 13, 14 y 15 se muestran la mezcla de la reacción el programa de temperaturas y los *assays* (ABI) usados en la qPCR relativa:

**Tabla 13:** mezcla de reacción para la qPCR relativa en modo fast.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl) por reacción</b>	<b>Concentración</b>
<b>Taq Man Master Mix Fast (ABI)</b>	5,0	2X
<i>Assay</i>	1,0	10X
<b>ADNc</b>	2,0	
<b>Agua libre de RNasas (DEPC)</b>	2,0	
<b>Volumen final</b>	10,0	

**Tabla 14:** condiciones de la qPCR para cuantificación relativa (modo fast)

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	20 segs	1
95°C	3 segs	40
60°C	30 segs	

**Tabla 15:** *assays* empleados en la cuantificación relativa de biomarcadores putativos en CaP

<b>Gen</b>	<b>Ref seq</b>	<b>Exón</b>	<b>Assay</b>	<b>Longitud amplicón</b>
<i>GSTP1</i>	NM_000852.2	4-5	Hs00943351_g1	75 pb
<i>DD3</i>		2-3	Hs01371938_m1	80 pb
<i>AMACR</i>	NM_203382.1 NM_014324.4	3-4 4-5	Hs01091294_m1	97 pb
<i>HEPSIN</i> ( <i>TMPRSS1</i> )	NM_182983.1 NM_002151.1	9-10 10-11	Hs01056332_m1	89 pb
<i>PAR-2</i>	NM_005242.3	1-2	Hs00173741_m1	102 pb
<i>TMPRSS2</i>	NM_005656.2	7-8	Hs01122332_m1	79 pb
<i>TMPRSS2</i>	NM_00113509.1 NM_005656.3	2-3	Hs01122328_m1	
<i>ERG</i>	NM_182918.1	1-2	Hs01573964_m1	128 pb
<i>ERG</i>	NM_182918.2 NM_004449.3	9-10 9-10	Hs01554635_m1	104 pb
<i>ETV1</i>	NM_004956.3	1-3	Hs00951944_m1	74 pb
<i>ETV1'</i>	NM_004956.3	5,6	Hs00951947_m1	89 pb
<i>ETV4</i>	NM_001986.1	10-11	Hs00383361_g1	70 pb

<i>ETV4</i>	NM_001986.1	2-3	Hs00944559_g1	53 pb
<i>Cav-1</i>	NM_01172895.1 NM_01172896.1 NM_01172897.1 NM_001753.4	2-3	Hs00971716_m1	66 pb

### 3.10.3. Método de análisis de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Los datos obtenidos en la PCR cuantitativa están expresados en Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral), este valor indica el ciclo en el que el termociclador en tiempo real empieza a detectar fluorescencia en la fase exponencial de la cinética de amplificación. Por tanto, este valor nos da una medida indirecta e inversa de la cantidad inicial de ADNc y por tanto de ARNm existente en nuestra muestra, de modo que a mayor Ct menor cantidad de ADNc y por tanto menos se expresa el gen estudiado. Una forma de calcular la expresión relativa de un determinado gen es utilizar el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que consiste en una transformación matemática para convertir los datos relativos en absolutos y analizando tanto los valores del gen problema con los de un gen constitutivo (303, 304). Este segundo método es el que se utiliza en este trabajo para medir la expresión génica de los 10 genes estudiados.

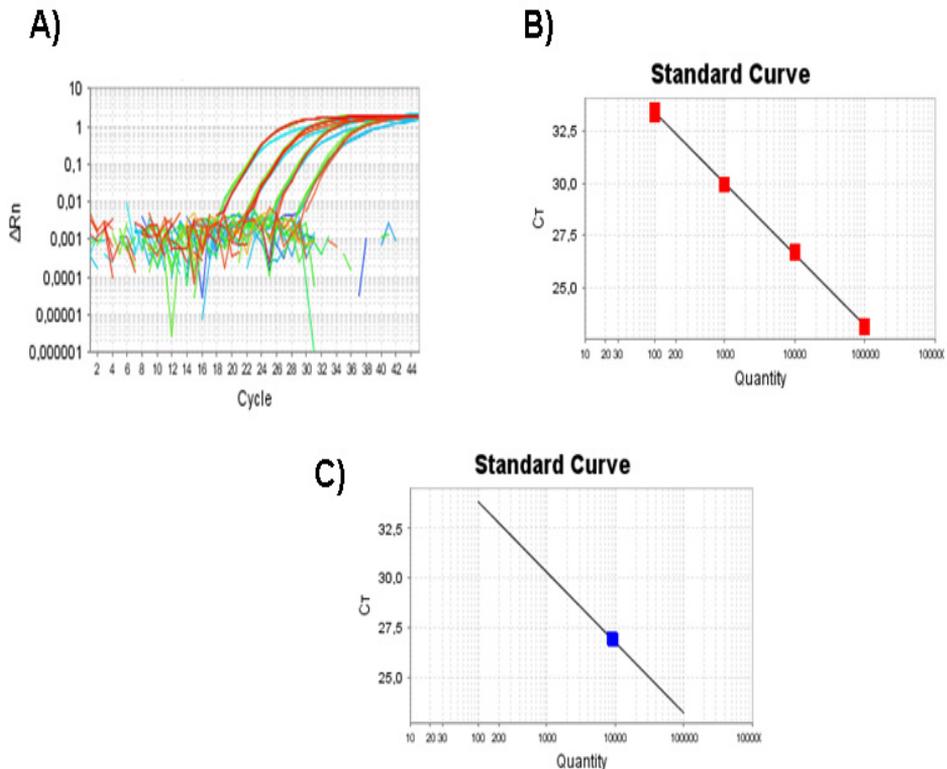
$\Delta Ct$  es la diferencia entre el Ct de nuestro gen problema y el Ct del gen constitutivo usado en el análisis y el  $\Delta\Delta Ct$  es la diferencia entre este primer  $\Delta Ct$  en nuestra muestra problema y un segundo  $\Delta Ct'$  correspondiente a una población (por ejemplo células normales) con la que queremos comparar los resultados de expresión del ARNm.(302).

Los datos obtenidos del análisis de expresión relativa se visualizan con métodos estadísticos de *clustering* no supervisado, que son un conjunto de técnicas que agrupan los datos obtenidos en función de una distancia sin considerar ninguna información a priori para organizar los resultados. Otra característica de este tipo de análisis es que es jerárquico. Es decir se trata de un método determinista que agrupa a los genes basándose en una matriz de distancias, para finalmente crear un dendograma que establece una relación ordenada entre los grupos definidos siendo la longitud de sus ramas la distancia entre los grupos. Hay varios modos de calcular la distancia entre los clusters que se van formando, el usado en esta tesis es *Average linkage* (algoritmo que agrupa iterativamente los clústers que presentan la distancia media más pequeña en cada paso del cálculo de la matriz de distancias). Los resultados se visualizan en un *heatmap* que es una gráfica bidimensional que agrupa

un código de colores según el nivel de sobre o infraexpresión de la muestra (rojo y verde respectivamente) (305).

### 3.10.2. Cuantificación absoluta de transcritos *TMPRSS2-ERG* en muestras de sangre periférica.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue medir la cantidad de CTCs por medio de RT-PCR cuantitativa usando una cuantificación absoluta. Esta técnica consta de la realización de una curva de concentraciones conocidas y la posterior interpolación de nuestras muestras en dicha recta. Figura 19.



**Figura 19:** cuantificación de expresión génica por una qPCR absoluta A) se obtienen los Ct de cada punto B) el software elabora una recta con las cantidades de amplicón de cada punto (en número de copias) y sus Ct. C) se interpolan los valores de nuestras muestras en la curva.

Para la elaboración de la curva para la cuantificación absoluta seguimos dos estrategias:

1<sup>a</sup>. *Dilución de células VCaP en una fracción de células mononucleadas de SP.* En este procedimiento se crea una curva de concentraciones conocidas de células de la línea VCaP que portan la fusión T1E4 mezclados con leucocitos a fin de aumentar la sensibilidad del método. En la siguiente tabla (16) se especifican los volúmenes y cantidades de células en cada punto.

**Tabla 16:** composición de la curva de diluciones de la línea celular VCaP.

Punto	Cantidad de leucocitos	Volumen dilución de leucocitos	Cantidad de células VCaP	Volumen dilución de células VCaP
C1	$10^6$	70 $\mu$ L	$10^6$	3500 $\mu$ L
C2	$2 \times 10^6$	140 $\mu$ L	$10^5$	350 $\mu$ L
C3	$2 \times 10^6$	140 $\mu$ L	$10^4$	35 $\mu$ L
C4	$2 \times 10^6$	140 $\mu$ L	$10^3$	3,5 $\mu$ L
C5	$2 \times 10^6$	140 $\mu$ L	$10^2$	0,35 $\mu$ L
C6	$2 \times 10^6$	140 $\mu$ L	0	0 $\mu$ L

En este caso la curva se realizó con diluciones 1:10 de células VCaP. Teóricamente los valores de Ct de una muestra y una dilución 1:2 de la misma deben diferir en 1, mientras que si la dilución es 1:10 la diferencia será de 3'3, así pues, este será el valor de la pendiente de la recta obtenida (306). El software interpola los valores de Ct de las muestras en esta recta (figura 19) y nos da un valor correspondiente a la equivalencia de la cantidad del gen de fusión en nuestra muestra con células VCaP. (285) Esta estrategia tiene varios puntos débiles, en primer lugar necesitamos un método fiable para cuantificar la dilución inicial de células, en este caso se usó un citómetro de flujo, después se lisan las células y se extrae el ARN y finalmente se hace la RT-PCR para obtener el cDNA, y es este cDNA el que se incluye en la curva. Por tanto se asume que las eficiencias de la extracción y de la RT-PCR son del 100%, lo que no es cierto. Por otro lado los resultados de expresión no se normalizan con respecto a un gen control. En este

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

método se valora la presencia de material viable en la muestra por medio de la expresión del gen constitutivo *β2-Microglobulina*.

2ª. *Construcción de una curva estándar con ADN plasmídico que contienen las secuencias de las isoformas más frecuentes de TMPRSS2-ERG (T1-E4 y T1-E5) con el fin de mejorar la exactitud y sensibilidad de esta prueba.* En este caso se requiere de una estandarización tanto para normalizar el contenido inicial en ARNm de la muestra, como la eficiencia del proceso, a este fin se cuantifica además un gen, es decir un gen que se exprese constitutivamente (*housekeeping*) y por tanto en la misma medida en todos los tipos celulares. Para ello se cuantifica el gen *ABL* (primers y sondas detallados en la tabla 19).

Una vez obtenidos los tres amplicones por PCR cualitativa (como se describe en el apartado 4.8) se procede a la clonación de los mismos (ver apartado 3.11) a fin de obtener los productos de PCR purificados y en la cantidad definida y suficiente para crear la recta de patrón de concentraciones conocidas necesaria en esta técnica. Por tanto esta aproximación aunque más laboriosa es más adecuada que el uso de diluciones de VCaP ya que soslaya los problemas de sensibilidad y reproducibilidad de dicho método.

Para calcular el número de copias inicial obtenido en la clonación a fin de elaborar las diluciones se siguen los siguientes pasos:

En primer lugar se suma la longitud del plásmido en pb (en este plásmido son 3931) con la longitud de los insertos.

Se calcula la masa de una sola molécula de plásmido con la siguiente fórmula:

$$m = n \times 1.96 \times 10^{-21}$$

Donde:

n = tamaño del plásmido en pb

m = masa en gr

$1,96 \times 10^{-21}$  es el peso en gr de un pb.

Se calcula la masa de cada punto de la recta de calibración multiplicando la masa de una sola molécula del plásmido por el número de copias presente en cada punto de la recta.

A partir de la masa de cada punto de la recta obtenemos la concentración dividiendo cada punto entre 5 (que es el número de  $\mu\text{l}$  que vamos a pipetear en la reacción de qPCR).

En último lugar, conociendo las concentraciones se preparan las diluciones según la fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

En las tablas 17 y 18 se especifican los reactivos y las condiciones de la qPCR respectivamente.

**Tabla 17:** volúmenes de reactivos para llevar a cabo la PCR cuantitativa de los dos transcritos de fusión más frecuentes (exón 1 de *TMPRSS2* y exón 4 de *ERG* y exón 1 de *TMPRSS2* y exón 5 de *ERG*) además del gen control *ABL*.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μl) por reacción</b>	<b>Concentración</b>
<b>Taq Man Master Mix (ABI) 2X</b>	10,0	1X
<b>Primer F (15 μM)</b>	0,6	0,45 μM
<b>Primer R (15 μM)</b>	0,6	0,45 μM
<b>Sonda (6 μM)</b>	0,6	0,18 μM
<b>ADNc (a partir de 200 ng de ARNm)</b>	2,0	
<b>Agua</b>	6,2	
<b>Volumen final</b>	20,0	

**Tabla 18:** Condiciones de la PCR cuantitativa para cuantificar el transcrito de las dos fusiones T1E4, T1E5 y el gen control *ABL*.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	10 segs	1
96°C	30 segs	35
62°C	30 segs	
68°C	50 min	
72°C	10 segs	1

En la tabla 19 se detallan las secuencias de las sondas TaqMan y primers usados. Las sondas usan FAM como fluoróforo y como quencher usan Minor Groove Binder (MGB), un atenuador especialmente indicado para estabilizar el apareamiento de sondas cortas, lo que permite obtener amplicones más cortos con mayor garantía de calidad.

Las sondas *TMPRSS2-ERG* (ex4) y *TMPRSS2-ERG* (ex5) fueron diseñadas con el software Primer Express v 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), los primers *TMPRSS2F* y *ERGR* se tomaron (185), el primer *ERG5B* de (307) y los primers ENF1003, ENF1003 y la sonda ENPR1043 de *ABL* de (308).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 19** Secuencias de primers y sondas TaqMan empleadas en la identificación de transcritos de fusión TMPRSS2-ERG en sangre periférico

ID primer/sonda	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón
Primer TMPRSS2 F	5'-TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG-3'	126 pb
Primer ERG R	5'-GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG-3'	
Sonda TMPRSS2:ERG (ex4)	5'-FAM-TGGAGCGCGGCAGGAAGCC-3'	19 pb
Primer ERG 5B R	5'-TCATCCCAACGGTGTCTGGGCTG-3'	146 pb
Sonda TMPRSS2:ERG (ex5)	5'-FAM-CCTGGAGCGCGGCAGGAAGCTC-3'	21 pb
Primer ENF1003 ABL	5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAGGT-3'	123 pb
Primer ENR1063 ABL	5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'	
Sonda ENPR1043 ABL	5'-FAMCCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACATT-TAMRA-3'	28 pb

### 3.11. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

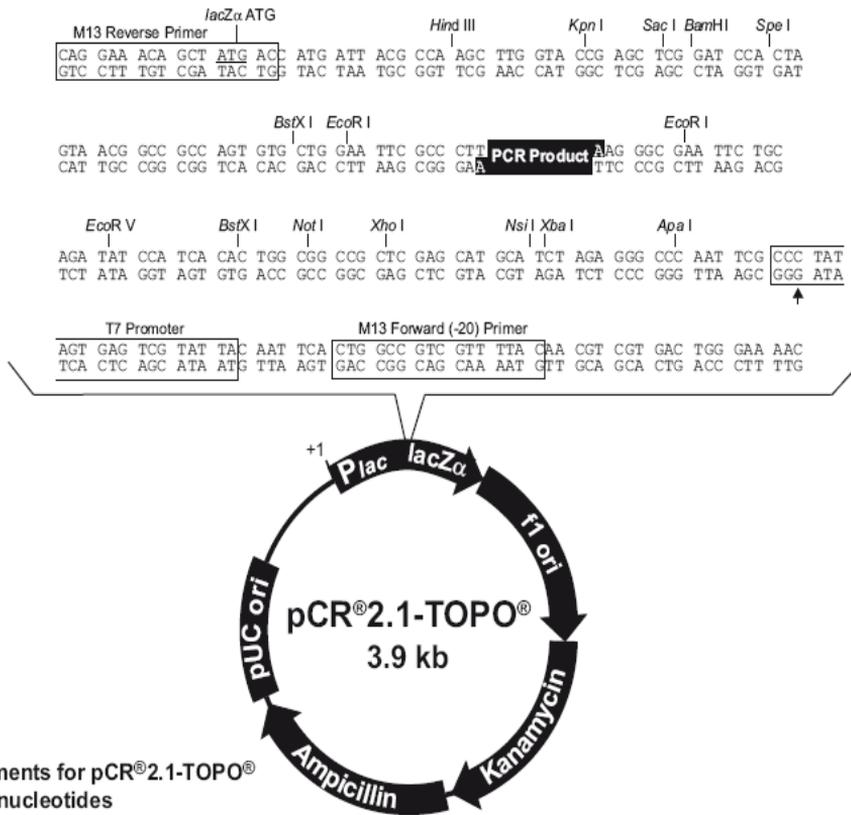
En este trabajo se usa la clonación con el fin de desarrollar un método de cuantificación absoluta por qPCR que nos permita cuantificar el número de copias del gen *TMPRSS2-ERG* en las muestras de SP que constituyen la rama prospectiva del trabajo. Aplicando este método se establece una equivalencia entre el Ct obtenido en una muestra y el número de copias del gen de fusión presentes en la misma, de modo que estos valores serán comparables entre distintos experimentos. A fin de conseguir esto, se construyen una serie de clones con los productos de PCR de las dos isoformas mayoritarias de *TMPRSS2-ERG* de modo que se construye una curva estándar de concentración conocida que se incluye dentro de cada experimento. Así, pueden interpolarse los valores de Ct con los de los puntos estándar y asignar un número de copias del gen a cada muestra de SP.

El objeto de la clonación es la obtención de secuencias de ADN muy puras y en la concentración necesaria para realizar curvas de concentración decreciente de las siguientes secuencias ABL, T1E4 y T1E5.

Dado que todas las copias del plásmido que obtengamos contendrán estos productos, conociendo la concentración exacta de DNA en la muestra podremos obtener el número de copias de la secuencia diana aplicando una transformación matemática. (ver apartado 3.10.2) Así pues, podemos construir una curva decreciente de diluciones con un número de copias de plásmido determinado y usando la técnica PCR cuantitativa podremos extrapolar la concentración (en número de copias de plásmido) de nuestra muestra.

Para la clonación de nuestros productos de PCR hemos utilizado el vector plasmídico pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) especialmente diseñado para este propósito.

En la figura 20 se muestra la estructura del plásmido en el que se insertan los productos de PCR con sitios de actuación de las enzimas de restricción y la situación de las secuencias M13 para analizar la estructura del plásmido por secuenciación directa.



**Figura 20:** Características del vector pCR® 2.1-TOPO® y de la secuencia flanqueante al sitio de clonación. Los sitios de restricción están marcados con su enzima correspondiente. Tomado del manual de usuario de TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

Para llevar a cabo la de clonación de productos de PCR en el vector pCR® 2.1-TOPO® se siguieron las indicaciones proporcionadas por el proveedor y que a continuación se describe brevemente:

1. En primer lugar, se realiza una PCR con primers específicamente diseñados para la secuencia que deseamos clonar (tabla 10 apartado 4.8) y siguiendo las concentraciones especificadas en la tabla 20:

**Tabla 20:** Reactivos y componentes de la reacción de amplificación con primers específicos para la obtención de los amplicones a clonar.

<b>Reactivo (concentraciones de trabajo)</b>	<b>Volumen (μl) por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>PCR buffer</b>	5,0	10X
<b>dNTPs (50 nM)</b>	0,25	0,25 nM
<b>Primers 200 ng/ μl</b>	1 μl c/uno	40 ng/μl
<b>Producto de PCR</b>	50 ng	
<b>Agua</b>	hasta 49 μl	
<b>Volumen final</b>	50,0	

Se multiplica por el número de casos a amplificar más un 10%.

Se clonaron las siguientes secuencias (las secuencias de los primers están subrayadas):

T1E4:

TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGGAGGGCGGAGGGGCG  
 AGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCCTTATC  
 AGTTGTGAGTGAGGACCAGTCGTTGTTGAGTGTGCCTAC

T1E5:

TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGGAGGGCGGAGGGGCG  
 AGGGGCGGGGAGCGCCGCCTGGAGCGCGGCAGGAAGCCTTATC  
 ATGAATGCAGTGTGGCCAAAGGCGGGAAGATGGTGGGCAGCCC  
AGACACCGTTGGGATGA

*ABL*:

TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGTGTGAAAAGCTCCG  
GGTCTTAGGCTATAATCACAAATGGGGAATGGTGTGAAGCCCAA  
CAAAAATGGCCAAGGCTGGGTCCCAAGCAACTACATC

Los productos de PCR se obtuvieron de la línea celular VCaP T1E4 y de una biopsia positiva para la translocación T1E5, se amplificaron las secuencias mediante una PCR específica usando como cebadores forward y reverse los fragmentos subrayados al principio y al final de las secuencias (ver tabla 10 del apartado 3.8).

La secuencia del gen *ABL* usado como gen control se obtuvo amplificando muestras de SP mediante PCR con los primers incluidos subrayados en la secuencia.

La reacción de amplificación se lleva a cabo con las siguientes condiciones de termociclación: Para los transcritos de T1-E4 y T1-E5 se siguió el programa detallado en la tabla 10 del apartado 4.8. En cambio para el gen control *ABL* se uso el programa especificado en la tabla 21 a continuación. Los programas de PCR usados en la clonación tienen una fase de elongación a 72°C prolongada (de 7 a 10 minutos a fin de obtener todos los productos de la misma longitud y que no se inserten en los plásmidos productos de PCR incompletos lo que nos disminuiría el rendimiento de la clonación.

**Tabla 21:** Condiciones de la PCR cualitativa usada en la amplificación del gen control *ABL*.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	10 segs	1
96°C	30 segs	35
62°C	30 segs	
68°C	50 min	
72°C	10 min	1

- Una vez obtenidos los productos de amplificación se procede a la reacción propia de clonación en un volumen final 6 µl tal y como se detalla en la tabla 22.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

**Tabla 22:** Reactivos y componentes de la reacción de clonación en el vector pCR® 2.1-TOPO®.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μl)</b>
<b>Producto de PCR</b>	2
<b>Solución de sal</b>	1
<b>Agua</b>	Hasta 5 μl
<b>Vector TOPO</b>	1 μl
<b>Volumen final</b>	6 μl

3. A continuación, se mezcla la reacción suavemente y se deja incubar 5 min. a temperatura ambiente.
4. Una vez finalizado el período de incubación, la reacción de clonación se guarda en hielo.
5. Se deja descongelar el vial de medio S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolic repressor*) a temperatura ambiente
6. Las placas petri con medio LB-agar donde se va a llevar a cabo la siembra se calienta a 37°C durante 30 minutos
7. A continuación, se siembran 40 μl de X-gal 40 mg/ml en cada placa LB y se deja incubar a 37°C hasta su uso.
8. Se descongela en hielo 1 vial de células One Shot® para cada una de las transformaciones.
9. Una vez descongelado, se añaden 2 μl de la reacción de clonación (punto 2) en el vial de E. Coli One Shot® y se mezcla suavemente, sin pipetear.

10. La mezcla se incuba en hielo 5-30 min.
11. A continuación, la mezcla se pasa a un baño de 42°C previamente calentado durante 30 segundos sin remover.
12. Tras el período de incubación, se transfieren los tubos inmediatamente a hielo.
13. Se añaden 250 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente.
14. El tubo se tapa fuertemente y se agita horizontalmente a 200 rpm durante 1 h a 37°C.
15. Se siembran entre 10-50 µl de cada transformación en una placa selectiva e incubar toda la noche a 37°C. Para asegurar que la siembra de pequeños volúmenes es efectiva, se añaden 20 µl de medio S.O.C.
16. Se tomaron entre 2-6 colonias blancas o azul claro para cultivarlas toda la noche en medio LB-líquido de 25 ml suplementado con 50 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina. (Figura 21)



**Figura 21:** Medio LB-agar de selección de colonias con el Plásmido con los productos de PCR incluidos. Los productos de PCR se insertan dentro del gen que codifica para la galactosidasa rompiendo su pauta de lectura, por lo que las colonias con inserto no podrán metabolizar la galactosa. En el medio hay X-gal, un reactivo que tiene galactosa unida a indol, un colorante azul. Por tanto las colonias de células con el inserto no metabolizarán el X-gal y no tendrán color, serán blancas a diferencia de las colonias que no hayan incluido el inserto que serán azules en el medio de selección LB.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

17. Los plásmidos se aislaron usando PureLink™ Quick Plasmid Miniprep kit de Invitrogen, para lo cual es necesaria la lisis celular en un medio alcalino con SDS.
18. Se obtuvo el sedimento de un cultivo incubado toda la noche ( $1-2 \times 10^9$  células de E. coli en medio LB) mediante centrifugación a 1200 rpm durante 20 min y eliminación completa del medio.
19. El sedimento se resuspendió en 250  $\mu$ l de tampón de resuspensión (R3) con RNasa A procurando que no queden grumos de células.
20. Se añaden 250  $\mu$ l de tampón de lisis (L7) a las células, mezclando suavemente el tubo 5 veces por inversión sin vortear.
21. A continuación, se deja incubar la mezcla durante 5 min. a temperatura ambiente.
22. Se añaden 350  $\mu$ l de tampón de precipitación (N4) mezclando inmediatamente invirtiendo el tubo hasta que la solución es homogénea.
23. Se centrifuga a 12000xg durante 10 min. a temperatura ambiente para clarificar el lisado de restos celulares.
24. A continuación, se pipetea el sobrenadante en una columna que se coloca en un tubo de lavado de 2 ml.
25. A continuación, se centrifuga a 12000xg 1 min, descartamos el precipitado y volviendo a poner la columna en el tubo de lavado.
26. Se añaden 500  $\mu$ l de tampón de lavado (W10) a la columna y se deja incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
27. Seguidamente se centrifuga a 12000xg 1 minuto.
28. Se desecha el precipitado en el tubo de lavado y la columna se coloca de nuevo en el tubo de lavado
29. Se añaden 700  $\mu$ l de tampón de lavado (W9) en la columna.
30. Se centrifuga a 12000xg 1 min. Descartamos el precipitado y volvemos a poner la columna en el tubo de lavado
31. Se centrifuga a 12000xg 1 minuto para eliminar el tampón de lavado (W9) remanente y se desecha el tubo de lavado con el precipitado.

32. La columna se coloca ahora en un tubo de Recogida de 1,5 ml. limpio.
33. Se añaden 75 µl de tampón TE pre-calentado (65-70°C) al centro de la columna y se deja incubar 1 min a temperatura ambiente.
34. Se centrifuga a 12000xg 2 minutos.
35. Confirmamos que se ha producido el inserto del producto de PCR mediante PCR con primers M13 y posterior secuenciación.

### **3.11. CONSTRUCCIÓN DE MATRICES TISULARES.**

Con el objeto de obtener un máximo rendimiento tanto de las muestras como de los análisis inmunohistoquímicos e hibridación fluorescente in situ, procedimos a la construcción de matrices tisulares con un arrayer manual de Beecher (MTA-I). Una matriz tisular consiste en la colocación de varios cilindros representativos de piezas tumorales en un solo bloque de parafina. De este modo se pueden procesar todos los casos incluidos simultáneamente disminuyendo la cantidad de reactivos y el tiempo. Otra ventaja es que el procesamiento de todos los tumores tiene lugar bajo las mismas condiciones técnicas (309, 310).

Se partió de 466 bloques de parafina conteniendo piezas quirúrgicas de prostatectomía radical. De cada uno de estos bloques se extrajeron 3 cilindros y con todos estos casos se construyeron 19 matrices tisulares. También se construyó otra matriz tisular con casos de tejido prostático normal consistente en dos cilindros por caso y conteniendo 30 casos.

Para la construcción de las matrices tisulares se siguió el siguiente protocolo:

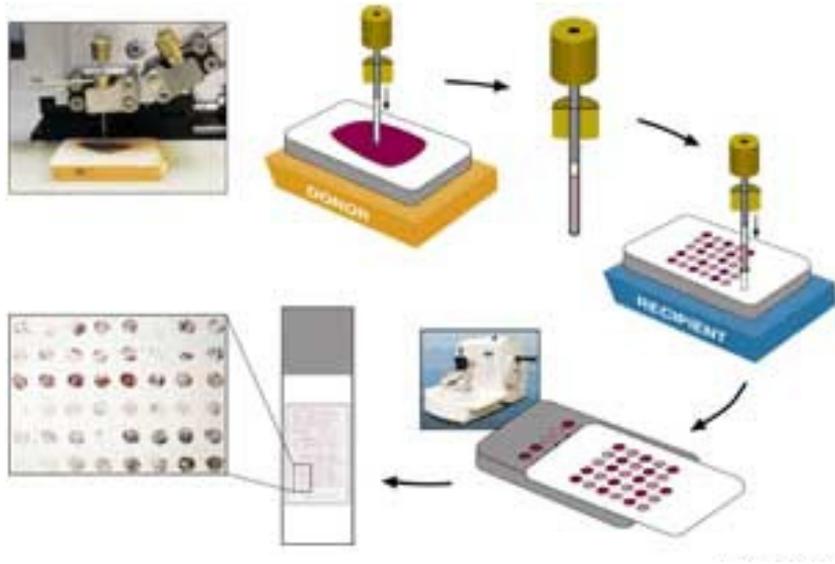
1. En primer lugar, se seleccionaron las zonas representativas de cada tumor a partir de portas con tinción hematoxilina-eosina de las cuales se tomaron las muestras.
2. A continuación, se enfrentaron los portas teñidos con su bloque correspondiente para identificar el área señalada.
3. Se confeccionó una plantilla en la que figura la posición exacta de cada uno de los cilindros en la matriz.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

4. Antes de incluir los cilindros tisulares en el bloque receptor, se procedió a alisar su superficie con un microtomo para que todos los cilindros tuvieran el mismo ángulo.
5. Seguidamente, se colocó el bloque receptor en la base del instrumento asegurándolo adecuadamente.
6. Se elige el juego de agujas de 0,6 mm. Situar a la izquierda la más gruesa que toma el cilindro de tejido del bloque donador y, a la derecha, la que agujereará el bloque receptor.
7. Se ajustan a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros.
8. En primer lugar se hace el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de aguja para profundizar 3 mm aproximadamente.
9. A continuación se coloca el bloque de tejido donador sobre el puente, se cambia la aguja y se toma el tejido tumoral marcado.
10. Se retira el puente con el bloque donador.
11. Se continúa expulsando el cilindro de tejido exactamente encima del agujero realizado en la parafina del bloque receptor, sin hundirlo.
12. Se coloca, encima del hueco, un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina.
13. Seguidamente, se cambia la medida del micrómetro a la siguiente posición para agujerear de nuevo.
14. De forma sucesiva, se repiten los pasos 6 a 12 hasta incluir todos los casos en el bloque.
15. Una vez el bloque receptor contiene los cilindros de todos los casos, se deja en una estufa de 37° C durante 24 horas para que los cilindros de tejido se adhieran bien a la parafina del bloque receptor.
16. Tanto para los estudios inmunohistoquímicos como para FISH se realizarán cortes de 3 µm que se recogen en portas de poli-lisina.

En la figura 22 se esquematiza todo este proceso.



**Figura 22:** Esquema de elaboración de un TMA con el tissue arrayer. Imagen tomada de microarraystation.com.

### 3.12- INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las técnicas IHQ son morfológicas y actúan localizando ag tisulares mediante su unión a ac específicos que usan un enzima conjugado como trazador, de modo que la unión ag-ac se visualiza añadiendo el sustrato de dicho enzima con una sustancia cromógena conjugada con lo que se forma un precipitado insoluble y coloreado.

A nivel inmunohistoquímico planteamos el estudio de expresión de diversos marcadores que se han relacionado con la biología del CaP. En la tabla 23 se detallan los anticuerpos empleados, así como la dilución empleada y las condiciones de desenmascaramiento antigénico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

**Tabla 23:** anticuerpos usados en el estudio IHQ con sus características más relevantes.

ANTÍGENO	CLON	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
PTEN	Ratón monoclonal (clon GH2-1)	1:100	Dako
Ki 67	Ratón monoclonal (clon MIB-1)	1:50	Dako
CD-99	Ratón monoclonal (clon 12E7)	1:50	Dako
TPD52	Conejo policlonal	1:200	Australia
Cav-1	Conejo policlonal	1:200	Santa Cruz Biot.
Cav-1	Conejo policlonal	1:2000	BD

En el presente trabajo se ha usado la técnica avidina-biotina-peroxidasa (ABC) con ac marcados indirectamente. El ac secundario se une al primario, que estaba previamente unido al ag de estudio. Esta técnica es muy adecuada para estudiar muestra FFPE ya que es muy sensible.

El protocolo seguido para llevar a cabo este proceso es el siguiente:

1. Los cortes de la matriz tisular se desparafinan calentándolas durante 12 a 24 h a 37°C en una estufa a 60°C. A continuación se sumergen en xilol durante 15 min a temperatura ambiente.
2. Las muestras se hidratan con alcoholes de concentración decreciente (90-80-70%) y se lavan con agua.
3. Realizamos un pretratamiento de recuperación antigénica introduciendo las muestras en una solución de tampón citrato 10X y después en un autoclave hasta una presión de 1,5 atmósferas durante 5 min. A continuación se descomprimen y enfrían lentamente los preparados.

4. Sumergimos las muestras en una solución de agua oxigenada (97 volúmenes de metanol al 2% y 3 volúmenes de agua oxigenada) a fin de inhibir la peroxidasa endógena durante 30 min a temperatura ambiente.
5. Se bloquea la colágena tisular para evitar la unión de las inmunoglobulinas al estroma con suero de caballo (Gibco) al 20% durante 20 min .
6. Se voltean los preparados y se le añade el ac primario durante 45-60 min a temperatura ambiente (según el ac).
7. Las secciones se lavan 3 veces con tampón fosfato (PBS) (cloruro de sodio, cloruro potásico, hidrogenofosfato de di- sodio y dihidrógenofosfato de potasio) (Gibco) y se incuba 30 min con el ac secundario.
8. A continuación se realizan 3 lavados con PBS y se añade el complejo avidina-biotina durante 30 min.
9. Tras el período de incubación se vuelve a lavar 3 veces las preparaciones con PBS y se revela la reacción con una solución diaminobenzidina tetrahidroclorehidrica (DAB) (Sigma) en un tampón de trishidroclorehidrico 0,2M hasta un pH neutro. Después de ajustar el pH se añade la DAB y por último el agua oxigenada pura de 110 volúmenes (para 100 ml de Tris se usan 75 mg de DAB y 50 µl de agua oxigenada). Durante el revelado, las preparaciones se protegen de la luz metiéndolas en una estufa de 37°C durante 5 min. Se lava con agua corriente.
10. Por último, los núcleos se contrastan con hematoxilina de Harris durante 30 seg, se deshidratan los cortes con alcoholes crecientes (70-80-90%) y se montan los cubreobjetos (Menzel-Glaser) con “entellan” (Merck co).

### **3.12.1.- Evaluación histopatológica**

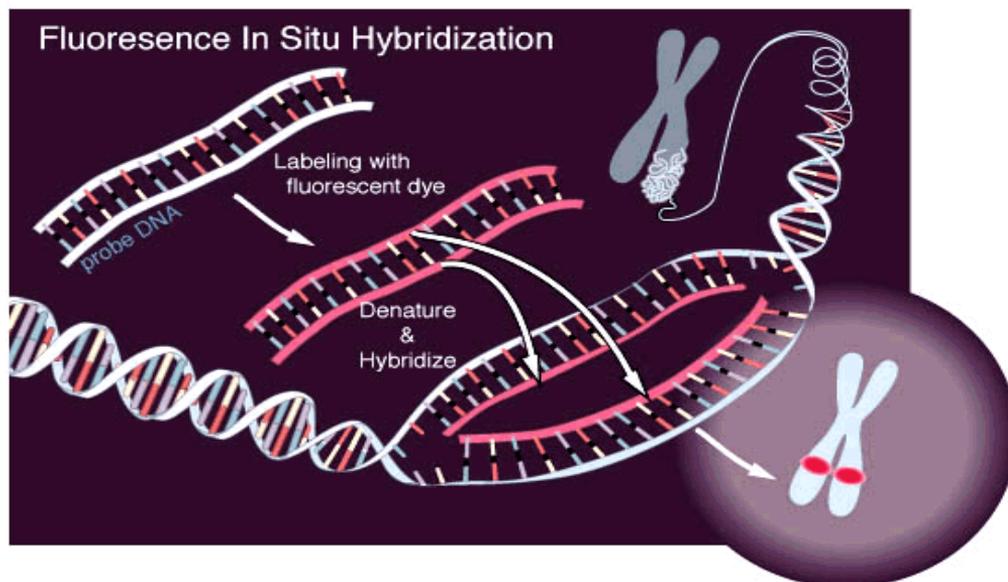
Los casos fueron evaluados por dos patólogos experimentados (A.C.F. e I.M.P.). Esta evaluación se llevó a cabo por la siguiente escala semicuantitativa:

- Negativo: < 5% de células reactivas.
- + de 5 a 25% de células reactivas
- ++ de 25 a 50% de células reactivas
- +++ > 50% de células reactivas

### 3.13 HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).

La técnica de FISH permite estudiar el ADN genómico mediante hibridación con sondas específicas marcadas con fluorescencia. Una sonda es una monohebra de ADN complementaria a nuestra diana marcada con moléculas fluoróforas (por ejemplo fluoresceína, *texas red*, rodamina, etc.). De modo que se codesnaturaliza nuestro ADN problema junto con las sondas permitiendo su hibridación que podemos localizar gracias a la señal fluorescente de la sonda. Figura 23. La sonda o sondas están diseñadas de tal manera que pongan de manifiesto anomalías genómicas como aneuploidías, amplificaciones génicas o translocaciones. En nuestro caso hemos optado por una sonda marcada con tres colores (uno en el gen *TMPRSS2*, otro en el gen *ERG* y la tercera en el espacio entre ambos genes) de modo que permitirá ver los reordenamientos que afectan a estos genes y además si estos reordenamientos son fruto de una translocación recíproca o de una delección intersticial.

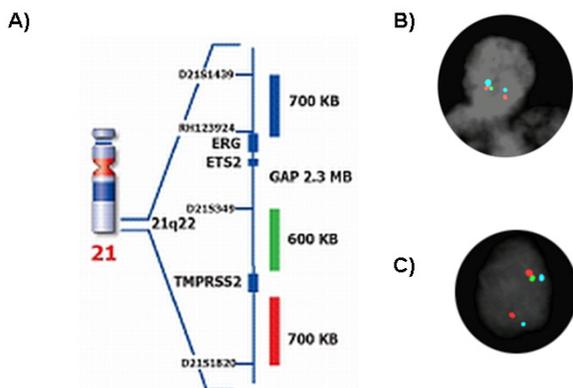
Una vez se ha hibridado la sonda, se lleva a cabo una contratinción con DAPI que marca inespecíficamente los ácidos nucleicos, de modo que se visualizarán los núcleos celulares en color azul. Esta contratinción es muy importante tanto para evaluar el grado de digestión del tejido, como para discriminar señales espúreas provenientes de núcleos lisados. Las señales se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros específicos capaces de leer la señal a las longitudes de onda características de los fluoróforos empleados.



**Figura 23:** mecanismo esquemático del proceso de hibridación en la técnica FISH. Tomada de <http://goo.gl/1pcgA>. Propiedad de Thomas Ried bajo licencia wikimedia commons.

Esta técnica se ha llevado a cabo sobre secciones de las matrices tisulares en núcleos en interfase, respetando la arquitectura celular (in situ) y se ha utilizado el Kits *TMPRSS2-ERG* (21q22) Del, Break, TC repeat free probes de Kreatech para la hibridación y y el kit de pretratamiento de muestras de Master Diagnostica (MAD-FISH-PKII).

Este kit de sondas está optimizado para detectar reordenamientos que afectan al locus 21q22, así como para discernir el mecanismo en este reordenamiento. Los patrones de señal mayoritarios son en primer lugar señal Roja Verde Azul (RVA) (no más separadas de la distancia de intensidad de la señal) indican un alelo no reordenado. Una pérdida de la señal verde indica microdelección porque se pierde la región intergénica (aproximadamente 3 Mb). Una translocación recíproca se observa con la rotura de una señal RVA en una señal R separada de una señal VA. Otro patrón es la presencia de una señal A separada de una RV cuando sólo *ERG* está implicado en el reordenamiento. Figura 24.



**Figura 24:** A) esquema de la posición de las 3 sondas fluorescentes en el cromosoma 21 para la detección de *TMPRSS2-ERG*. B) ejemplo de un núcleo con un alelo normal (señal RVA) y otro reordenado por microdelección (RA) C) ejemplo de un reordenamiento en el que se pierde la señal *ERG* lo que nos indica que *TMPRSS2* está fusionado con otro gen (*ETV1*, *ETV4*, etc..). Imágenes tomadas de <http://goo.gl/OsfDO>. Las fotografías de núcleos hibridados están cedidas por el Dr. Texeira (Oporto) (191, 311, 312)

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

En el proceso de hibridación se siguió un protocolo de tres días que se detalla a continuación:

### **Día 1**

#### *Preparación de la sección de tejido a estudiar*

1. De las matrices tisulares se cortan secciones de 2-3 $\mu$ m y se montan sobre un portaobjetos pre-tratado (cargado positivamente para que se adhiera la muestra).
2. Los portaobjetos se incuban toda la noche a 59°C en estufa o sobre placa calefactora.

### **Día 2**

#### *Desparafinación de los portas*

1. Se introducen los cortes en dos baños sucesivos con xilol durante 10 min.
2. Se sumergen en dos baños durante 5 min cada uno de etanol 100%
3. Realizamos otro baño de 5 min en etanol al 80%.
4. Se sumergen los cortes en etanol 70% 5 min.
5. Por último, dejamos una hora los cortes en agua destilada para lavar.

#### *Pretratamiento por calor*

1. Se colocan 50 ml de Tiocianato de sodio (listo para uso) en una jarra Coplin y precalentar en un baño de agua a 80°C (al menos 30 minutos).
2. Paralelamente se prepara una solución de trabajo de HCl 0,2N.
3. Las preparaciones se sumergen en una jarra Coplin con HCl 0,2N durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Los portas se lavan con agua destilada durante 3 min.
5. A continuación, los portaobjetos se colocan tiocianato de sodio durante 30 min.

6. Transcurrido este tiempo, los portas se lavan con SSC 2X durante 3 min a temperatura ambiente.

### *Digestión enzimática con pepsina*

1. Reconstituimos cada vial de pepsina incluido en el kit con 1,5 ml de agua destilada, se alícuota en tubos eppendorf con 250  $\mu$ l. Se almacena congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En cada hibridación usaremos uno de estos viales.
2. Se prepara la solución de trabajo de pepsina que consta de
  - 50 ml de agua destilada
  - 250  $\mu$ l de HCl 2N
  - 250  $\mu$ l de solución de pepsina
3. Se vierte la solución en una jarra Coplin y se precalienta el baño a  $37^{\circ}\text{C}$  al menos 30 min antes de introducir los portas.
4. Introducimos las secciones de tejido en esta solución y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min (no es recomendable procesar más de 5-6 portas simultáneamente en esta solución).
5. Se lava en tampón en SSC 2X, 5 min a temperatura ambiente.
6. Deshidratamos las preparaciones en alcoholes crecientes:
  - i. Etanol 70% 3 minutos
  - ii. Etanol 80% 3 minutos
  - iii. Etanol absoluto 3 minutos

### *Desnaturalización/Hibridación*

(A partir de este paso las preparaciones y las sondas fluorescentes se manejan, en oscuridad, evitando la exposición prolongada a la luz ambiental)

1. Aplicamos 10  $\mu$ l de sonda sobre el porta.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

2. Se colocan en la ranura central de la cámara húmeda (Termo HyBryte) un papel de filtro húmedo para mantener la humedad en el aparato durante el proceso.
3. Colocamos un cubreobjetos y desnaturalizamos la preparación en la cámara húmeda 5 minutos a 80°C.
4. Sellamos el porta con pegamento y se incuba en una cámara húmeda 16 horas a 37°C.

### Día 3

#### *Lavados de posthibridación*

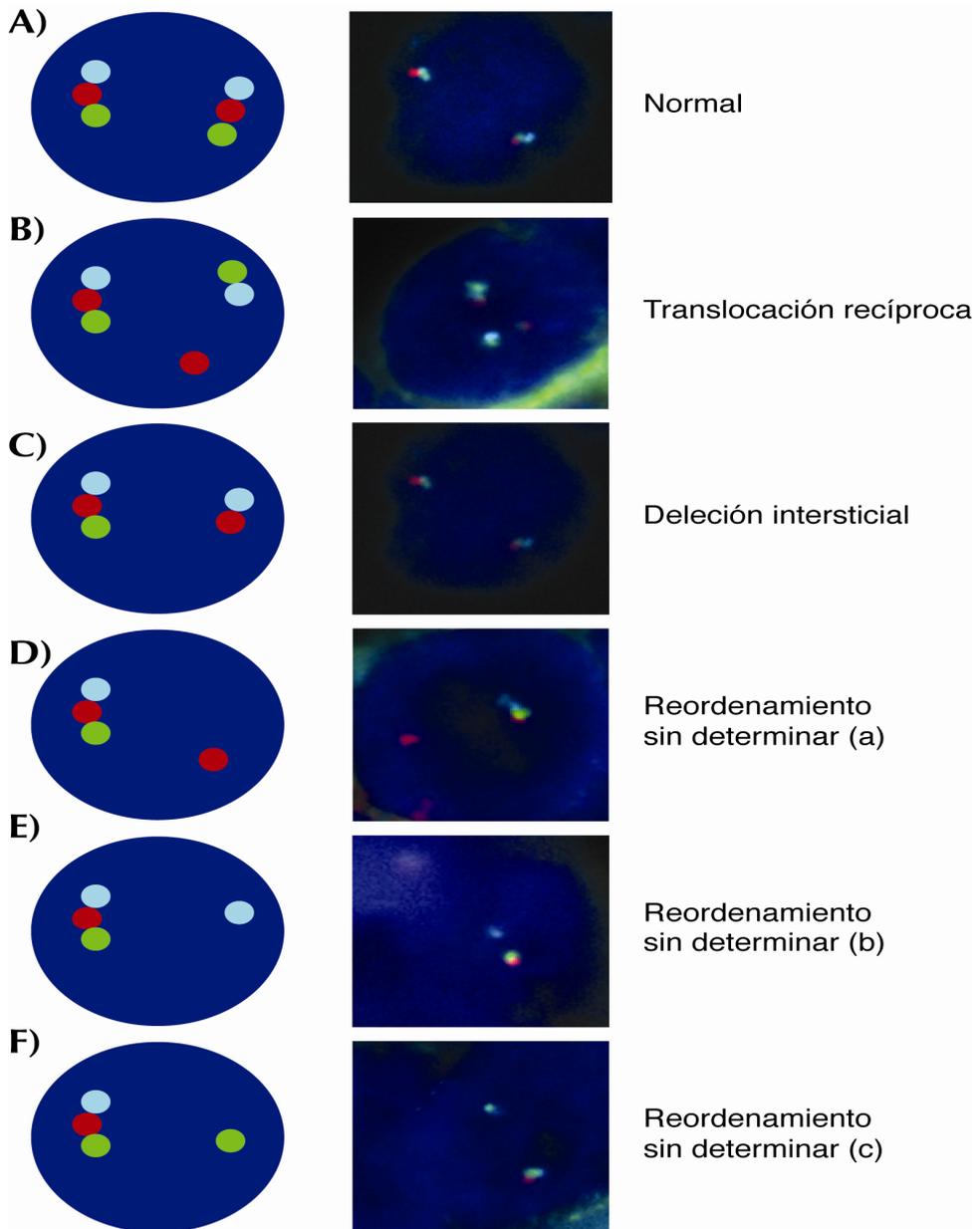
1. Retiramos el cubreobjetos sumergiendo los portas en solución de lavado post-hibridación a temperatura ambiente.
2. Se lavan los portas en la solución de lavado precalentada, 2 minutos a 75°C. (No es recomendable lavar simultáneamente más de 5 ó 6 portas).
3. Lavamos ligeramente (unos segundos) con agua destilada y se deja secar al aire.

#### *Contratinción:*

1. Se pipetea 20 µl de DAPI II en el área diana y cubrimos con un cubreobjetos de tamaño adecuado.
2. Las preparaciones se han de almacenar a -20°C en una caja oscura durante un mínimo de 20-30 minutos antes de su observación al microscopio de fluorescencia

### **3.13.3 Interpretación de señales.**

Se contaron las señales fluorescentes a fin de establecer patrones que nos indiquen si la muestra presenta reordenamientos o no. Además se busca establecer un patrón presente en las muestras que presentan delección distinto de las que presentan translocación balanceada. También es importante establecer puntos de corte, dado que es una técnica en la que se cuentan núcleos que pueden presentar un patrón claramente mayoritario, o bien tener una marcada heterogeneidad. En nuestro caso se han asignado las señales como se refleja en la figura 25. Siendo el punto de corte la presencia de un 15% de células con anomalías cromosómicas. Dicho punto de corte y los patrones se han obtenido del análisis de 20 muestras de tejido prostático normal adyacente al tumoral en piezas FFPE obtenidas de prostatectomías radicales.



**Figura 25:** asignación de los mecanismos de reordenamiento génico con los patrones obtenidos por FISH. 1 ó más señales de fusión (RVA) indican un núcleo no reordenado, una señal de fusión acompañada de una señal azul y verde y de otra roja separada, o bien sólo una azul y verde es indicativa de translocación recíproca, 1 señal de fusión y otra roja y azul fusionada indica un reordenamiento causado por una delección intersticial, mientras que una señal de fusión acompañada de una señal azul, una roja o una verde se ha asignado a un reordenamiento sin determinar.



### 3.15- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.

Para el análisis estadístico de los datos clinicopatológicos se diseñó específicamente una base de datos ubicada en el servidor de la FIVO, así como otra base de datos con las características moleculares de los pacientes incluidos en la serie. Posteriormente se unificaron y codificaron todos los datos y se analizaron con el software SPSS v15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

El análisis estadístico busca obtener relaciones entre los datos moleculares (expresión génica y mecanismo de reordenamiento) y de expresión proteica con factores clinicopatológicos a fin de obtener parámetros predictores que refinen el pronóstico en CaP. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con una significación del 0,05 y las estimaciones con un intervalo de confianza de 95%.

#### 3.15.1- Estadística descriptiva.

En la descripción de las variables se incluyó el cálculo de los distintos estadísticos de distribución (media, mediana, intervalo, desviación típica y frecuencia de sucesos) mediante las fórmulas habituales.

#### 3.15.2- Estadística analítica.

Previamente a los análisis de supervivencia univariantes y multivariantes se llevó a cabo una correlación de los datos categorizados por el método  $\chi^2$  y test exacto de Fisher cuando la frecuencia es menor de 5, así como las correlaciones de Pearson.

##### Métodos univariantes:

Para el análisis univariante de la supervivencia se estudiaron el intervalo libre de progresión bioquímica (ILPB) tiempo entre la prostatectomía radical (PTR) y el aumento de la concentración de PSA por encima de 0,2 ng/ml e intervalo libre de progresión (ILP) ya sea local o a distancia mediante el test de riesgo proporcional del método de Kaplan-Meier aplicándole test de *log-rank* (313, 314). Se consideró como inicio la fecha de la intervención quirúrgica y como final la fecha del evento de progresión o bien la última revisión clínica o muerte del paciente.

##### Métodos multivariantes:

Para el análisis de factores pronósticos con influencia sobre la supervivencia de los pacientes de nuestra serie se usa el método de regresión múltiple de riesgos proporcionales de Cox (315). Este método asocia un conjunto de

variables predictoras con una variable respuesta (supervivencia). Este método gestiona los casos censurados y estima los coeficientes para cada una de las variables, evaluando el impacto de múltiples covariables en el mismo modelo.

El modelo está constituido de dos términos el primero depende del tiempo y el segundo de las variables asociadas (factores de riesgo).

En primer lugar se determinó que las variables clinicopatológicas y la presencia del gen de fusión son variables explicativas o predictoras. La medida de efecto de cada variable se calculó a través del Hazard Ratio (HR) o riesgo relativo (RR).

### **3.16- ANÁLISIS SERIE RETROSPECTIVA Y PROSPECTIVA.**

En la presente tesis se han analizado dos series independientes de pacientes con CaP tratados con prostatectomía radical. Una serie retrospectiva cuyo principal objetivo es la caracterización del gen de fusión *TMPPRSS2-ERG*, así como de la expresión génica y proteica de genes relacionados con esta enfermedad; y por otro lado, establecer el valor pronóstico de todos estos parámetros. La segunda serie es prospectiva en la que además de caracterizar *TMPPRSS2-ERG* en las piezas quirúrgicas, se pretende emplear este marcador en la identificación y cuantificación de CTC en el manejo clínico del CaP.



# RESULTADOS



En aras de una mayor claridad expositiva, en los resultados se exponen primero los resultados referentes a los objetivos del análisis de la serie retrospectiva en muestras FFPE. En una segunda parte de este apartado se exponen los resultados obtenidos de la serie prospectiva compuesta tanto por muestras FFPE como de SP.

### **4.1- SERIE RETROSPECTIVA.**

#### **4.1.1- Estadística descriptiva.**

En la tabla 24 se detallan los PCP analizados, así como la evolución de los 314 pacientes incluidos en el subestudio retrospectivo con un seguimiento mediano de 83,8 meses (2,1-159,8 m).

**Tabla 24:** PCP característicos de la serie retrospectiva

<b>Parámetro</b>	<b>n=314 (%)</b>
<b>Edad</b> mediana (rango)	67,4 años (49-84)
<b>PSA inicial</b> <10ng/ml 10-20ng/ml >20ng/ml	184 (58,6) 86 (27,4) 44 (14)
<b>Gleason-sp*</b> 2-6 7 >7	137 (43,6) 143 (45,5) 34 (10,8)
<b>cT</b> ≤ cT2c > cT3a	291 (92,7) 23 (7,3)
<b>pT</b> ≤pT2c ≥pT3a	167 (53,2) 147 (46,8)
<b>Ganglios afectos (N)</b> No Si	274 (87,3) 12 (3,8)
<b>PIN</b> Ausente Presente	239 (76,1) 46 (14,6)
<b>Infiltración perineural</b> Ausente Presente	129 (42,1) 142 (45,2)
<b>Progresión bioquímica</b> No progresan Progresan	186 (59,2) 128 (40,8)
<b>Progresión clínica</b> No progresan Progresan	240 (76,4) 74 (23,6)

\*Gleason-sp: Gleason de la pieza quirúrgica.

**4.1.2- Determinación de *TMPRSS2-ERG* por RT-PCR.**

De los 314 CaP analizados, 145 (46,2 %) expresaron el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* determinado mediante RT-PCR. En estas muestras se analizó la correlación entre la presencia del gen de fusión y las variantes clínico-patológicas citadas en la tabla 25.

**Tabla 25:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y el gen *TMPRSS2-ERG*\*.

<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> positivo</b>	<b>p</b>
<b>PSA inicial</b>			
<10 ng/ml	99 (58,5%)	85 (58,6%)	0,692
10-20 ng/ml	44 (26%)	42 (28,9%)	
>20 ng/ml	26 (15,4%)	18 (12,4%)	
<b>Score de Gleason</b>			
2-6	68 (40,2%)	69 (47,6%)	0,09
7	77 (45,6%)	66 (45,5%)	
8-10	24 (14,2%)	10 (6,9%)	
<b>cT (estadio clínico)</b>			
≤cT2c	153 (90,5%)	138 (95,2%)	0,086
≥cT3a	16 (9,5%)	7 (4,8%)	

## RESULTADOS

**Tabla 25 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y el gen *TMPRSS2-ERG*\*.

Parámetro	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> positivo	p
<b>pT (estadio patológico)</b>			
Órganoconfinado	91 (53,8%)	76 (52,4%)	0,444
Extraprostatico	78 (46,1%)	69 (47,6%)	
<b>PIN</b>			
Ausencia	127 (84,1%)	112 (91,8%)	0,516
Presencia	24 (15,9%)	22 (16,4%)	
<b>Infiltración perineural</b>			
Ausente	90 (54,2%)	67 (46,5%)	0,516
Presente	76 (45,8)	77 (53,5)	
<b>Progresión bioquímica</b>			
No progresan	94 (55,6%)	92 (63,4%)	0,098
Progresan	75 (44,4%)	53 (36,6%)	
<b>Progresión</b>			
No progresan	129 (76,3%)	111 (76,5%)	0,536
Progresan	40 (23,7%)	34 (23,5%)	

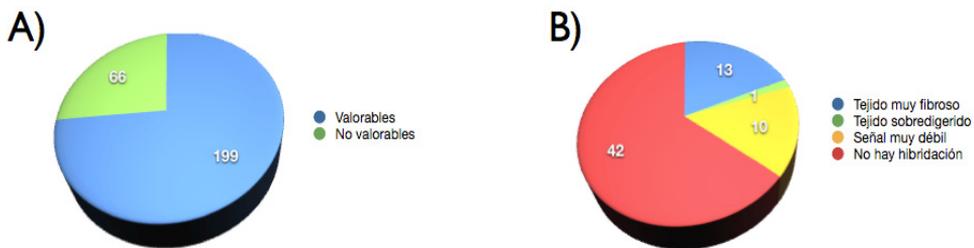
\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número (12) de casos válidos.

No se observa asociación entre la presencia del gen de fusión y ninguno de los PCP.

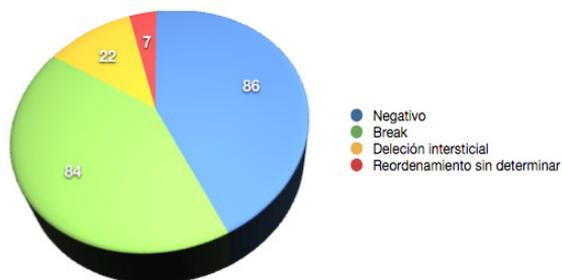
### 4.1.3- Estudio de *TMPRSS2-ERG* por Hibridación In Situ Fluorescente (FISH).

La serie retrospectiva analizada por FISH consta de 265 casos de los que se disponía de material para llevar a cabo la hibridación, de los cuales 199 resultaron valorables (Ver figura 27). De entre los casos valorados, 86 (43,2%) no presentaron el reordenamiento mientras que de los 113 (56,8%) restantes (positivos para la fusión), 84 presentan un patrón de *Break* (1RVA+1VA), 22 debido a deleción intersticial y 7 corresponden a mecanismos sin determinar (figura 28 y 29). Para la asignación de patrones de reordenamiento a las señales de FISH se siguió el criterio detallado en la figura 25 del apartado 4.13.3 de Material y Métodos.

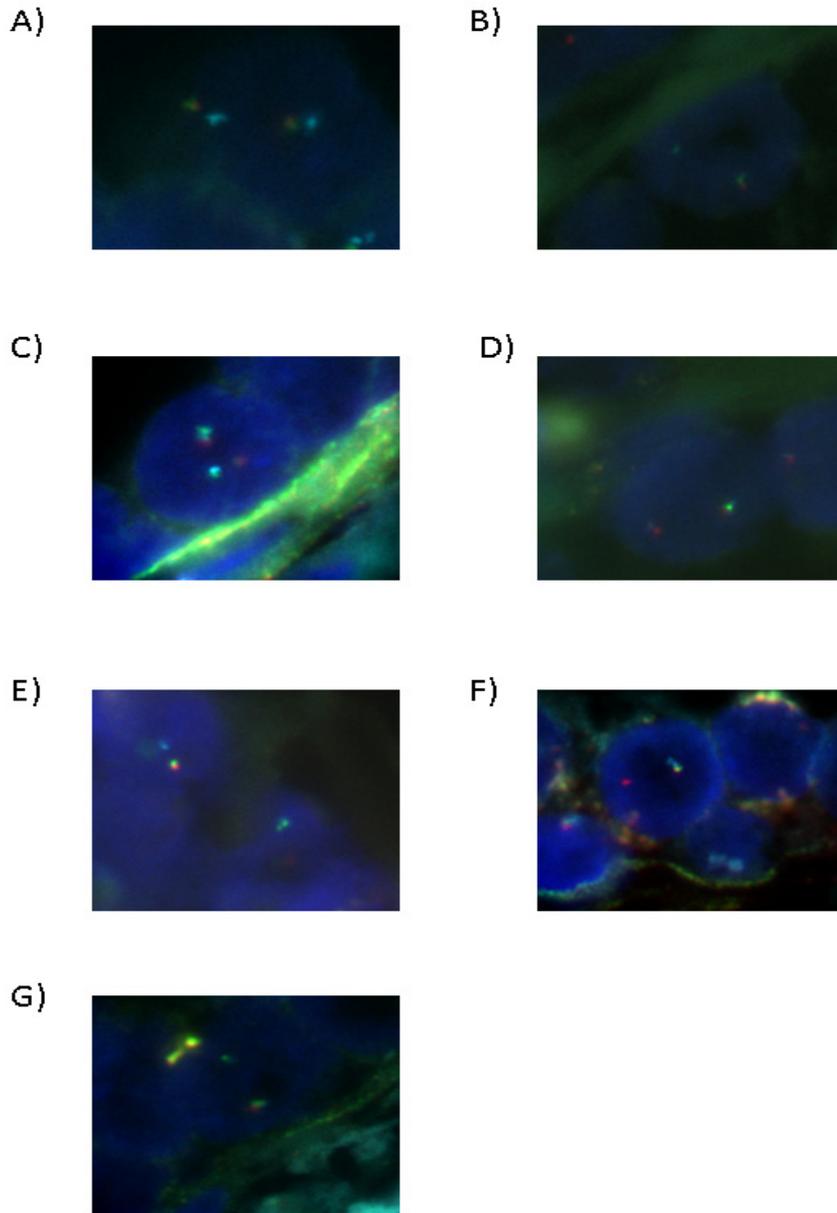
El principal motivo que impidió la valoración de señales de los 66 casos fue la ausencia de hibridación (figura 27 B).



**Figura 27:** esquema explicativo de los casos valorables y no valorables. A) Casos valorables y no valorables B) motivos por los que no se han podido valorar los casos.



**Figura 28:** diagrama representativo de los resultados del análisis por FISH en la serie retrospectiva según el mecanismo de reordenamiento.



**Figura 29:** Fotos del análisis por FISH A) 2 señales RVA correspondientes a dos alelos normales B) 1RVA + 1 RV correspondiente a un patrón de *Break C*). 1RVA + 1VA + 1R correspondiente a una translocación recíproca D) 1RVA + 1RA correspondiente a una delección intersticial E) F) G) 1RVA + 1A/ 1R / 1 V correspondientes a reordenamientos con un mecanismo sin determinar.

En la correlación entre los PCP más importantes con los resultados del mecanismo de fusión de *TMPRSS2-ERG* se ha eliminado el patrón reordenamiento sin determinar, con lo que los casos positivos son debidos al patrón Break o deleción intersticial. Sólo la presencia de infiltración perineural presenta una relación directa con la presencia de *TMPRSS2-ERG* por translocación recíproca. Tabla 26 y figura 30.

**Tabla 26:** correlación entre el mecanismo de reordenamiento *TMPRSS2-ERG* y los PCP \*.

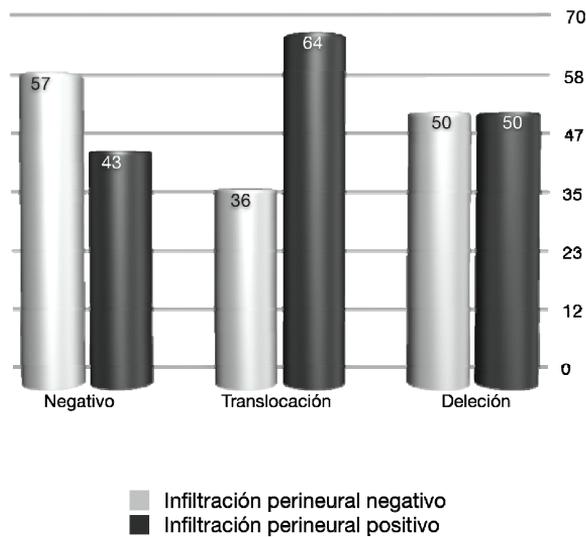
<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>Break</i></b>	<b>Deleción intersticial</b>	<b>p</b>
<b>PSA inicial</b>				
<10 ng/ml	51 (59%)	46 (54,8%)	16 (72,7%)	0,494
10-20 ng/ml	25 (29,1%)	24 (28,6%)	3 (13,6%)	
>20 ng/ml	10 (11,6%)	14 (16,6%)	3 (13,6%)	
<b>Score de Gleason</b>				
2-6	35 (40,7%)	32 (38,1%)	25 (41%)	0,353
7	37 (43%)	45 (53,6%)	32 (52,4%)	
8-10	14 (16,3%)	7 (8,3%)	4 (6,5%)	
<b>cT (estadio clínico)</b>				
≤cT2c	78 (90,7%)	77 (91,6%)	22 (100%)	0,399
≥cT3a	8 (9,5%)	7 (8,3%)	0 (0%)	
<b>pT (estadio patológico)</b>				
Órganoconfinado	41 (47,7%)	38 (45,2%)	12 (54,5%)	0,737
Extraprostático	45 (52,3%)	46 (54,8%)	10 (45,5%)	

## RESULTADOS

**Tabla 26 (cont.):** correlación entre el mecanismo de reordenamiento *TMPRSS2-ERG* y los PCP \*.

<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>Break</i></b>	<b>Delección intersticial</b>	<b>p</b>
<b>PIN</b>				
Negativo	64 (82%)	66 (84,6%)	17 (81%)	0,949
Positivo	14 (18%)	13 (16,4%)	4 (19%)	
<b>Infiltración perineural</b>				
Negativos	49 (57%)	30 (36%)	11 (50%)	<b>0,02</b>
Positivos	37 (43%)	54 (64%)	11 (50%)	
<b>Progresión bioquímica</b>				
Negativo	57 (66,3%)	47 (55,9%)	13 (59,1%)	0,379
Positivo	29 (33,7%)	37 (44,1%)	9 (40,9%)	
<b>Progresión</b>				
Negativo	69 (80,2%)	62 (73,8%)	17 (77,3%)	0,609
Positivo	17 (19,8%)	22 (26,2%)	5(22,7%)	

\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número (12) de casos válidos.



**Figura 30:** relación de la presencia del mecanismo de reordenamiento de *TMPRSS2-ERG* con la infiltración perineural ( $p=0,02$ ).

#### 4.1.4.- Comparación entre las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) y RT-PCR.

Otro aspecto interesante es la comparación entre las dos técnicas empleadas en este trabajo para la detección de *TMPRSS2-ERG*. La técnica del FISH está considerada como el estándar en la detección de genes reordenados debido a su sensibilidad y especificidad, a que preserva la arquitectura tisular y a que al analizar el ADN genómico no depende de la expresión del gen de fusión. También se ha empleado la RT-PCR en la detección de estos genes, que presenta otras ventajas como su rapidez y una mayor objetividad en su interpretación, aunque por otro lado esta última técnica es más sensible a la contaminación cruzada. En la siguiente tabla de contingencia se presenta la comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas (tabla 27).

## RESULTADOS

**Tabla 27:** tabla de contingencia relacionando los resultados de la detección de *TMPRSS2-ERG* por RT-PCR y por FISH.

		FISH		p
		Negativo	Positivo	
RT-PCR	Negativo	80 (80,8%)	19 (19%)	< 0,001
	Positivo	19 (19,2%)	81 (81%)	

La RT-PCR tiene una sensibilidad del 81 %, una especificidad del 87 % un Valor Predictivo Positivo (VPP) del 86 % y un Valor Predictivo Negativo (VPN) del 82 % con respecto a la técnica de FISH. Considerando a FISH como la técnica de referencia, obtendríamos la misma tasa (19%) de falsos positivos y falsos negativos para la determinación de RT-PCR de la fusión.

Dado que el valor de concordancia (81%) es directo y significativo, en adelante para los análisis se considerarán portadores del reordenamiento *TMPRSS2-ERG* a todos los casos positivos para el gen de fusión por RT-PCR, por FISH o por ambas técnicas. Así, en la serie retrospectiva identificamos 164 (52,2%) casos positivos. En la tabla 28 figuran las relaciones entre la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* siguiendo este criterio reunificado con los PCP más relevantes en el CaP. Estos análisis muestran que el único PCP que se asocia con la presencia del gen de fusión es la infiltración perineural, de modo que aproximadamente el 55% de los casos portadores del gen de fusión presentan infiltración perineural, frente al 43% de los casos negativos para el gen de fusión ( $p=0,033$ ; tabla 28 y figura. 31)

**Tabla 28:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los PCP, SLPB y SLP y la presencia de gen de fusión detectado por FISH o RT-PCR\*.

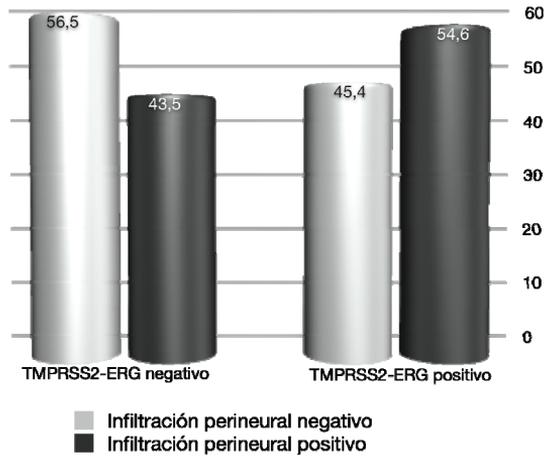
<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> positivo</b>	<b>p</b>
<b>PSA inicial</b> <10 ng/ml 10-20 ng/ml >20 ng/ml	90 (60%) 38 (25,3%) 22 (14,7%)	94 (57,3%) 48 (29,3%) 22 (13,4%)	0,731
<b>Score de Gleason</b> 2-6 7 8-10	63 (42%) 65 (43,3%) 22 (14,7%)	74 (45,1%) 78 (47,6%) 12 (7,3%)	0,111
<b>cT (estadio clínico)</b> ≤cT2c ≥cT3a	136 (90,7%) 14 (9,3%)	155 (94,5%) 9 (5,5%)	0,138
<b>pT (estadio patológico)</b> Órganoconfinado Extraprostático	82 (54,7%) 68 (45,3%)	85 (51,8%) 79 (48,2%)	0,348

## RESULTADOS

**Tabla 28 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los PCP, SLPB y SLP y la presencia de gen de fusión detectado por FISH o RT-PCR\*.

<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> positivo</b>	<b>p</b>
<b>PIN</b> Ausencia Presencia	111 (83,5%) 22 (16,5%)	128 (84,2%) 24 (15,8%)	0,495
<b>Infiltración perineural</b> Negativos Positivos	83 (56,5%) 64 (43,5%)	74 (45,4%) 89 (54,6%)	<b>0,033</b>
<b>Progresión bioquímica</b> No progresan Progresan	87 (58%) 63 (42%)	99 (60,4%) 65 (39,6%)	0,378
<b>Progresión</b> No progresan Progresan	116 (77,3%) 34 (22,7%)	88 (77,9%) 25 (22,1%)	0,411

\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número de casos válidos (12).

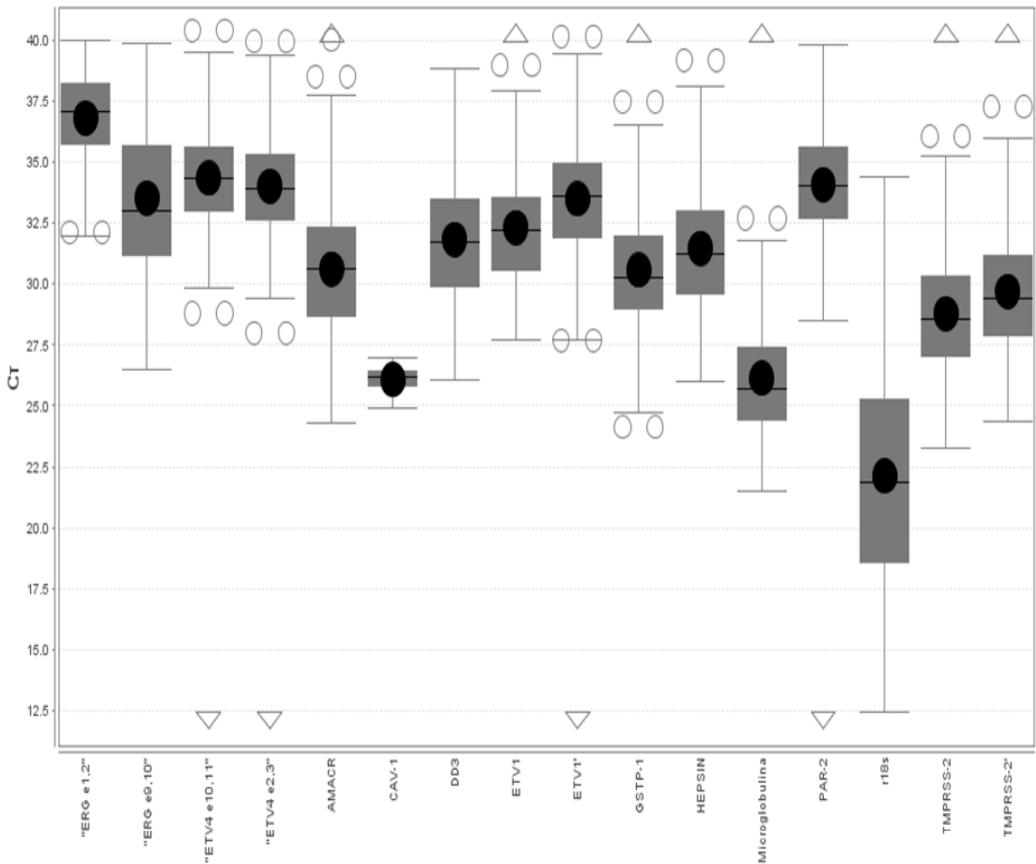


**Figura 31:** relación de la presencia de *TMPRSS2-ERG* determinado por RT-PCR o por FISH con la infiltración perineural ( $p=0,033$ ).

#### 4.1.5.- Análisis de la expresión génica.

En las 314 muestras de esta serie, se analizó la expresión de los genes: *TMPRSS2* (entre los exones 2 y 3 y 7 y 8), *ERG* (entre los exones 1 y 2 y 9 y 10), *ETV1* (entre los exones 1 y 3 y entre 5 y 6), *ETV4* (entre los exones 10 y 11 y entre 2 y 3), *PCA3* (*DD3*), *HEPSIN*, *PAR-2*, *GSTP-1*, *AMACR* y por último *Caveolina-1*. Los genes que están analizados en dos puntos están implicados en fusiones génicas *TMPRSS2-ETS*, de modo que los casos reordenados deberían mostrar una expresión diferencial en estos dos puntos. En la figura 32 se pueden ver los diagramas en cajas con los Ct obtenidos en el análisis de expresión de los genes, lo que da una idea de la dispersión de los datos adquiridos. Los valores de la expresión de estos genes se han normalizado y cuantificado con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (sección 4.3.10 Material y Métodos) y se han categorizado como menores que la mediana de expresión (infraexpresión) y mayores o iguales que la mediana (sobrexpresión) (Tabla 29).

## RESULTADOS



**Figura 32:** diagrama en cajas que representa Ct media para los distintos genes analizados y en el que se muestra la dispersión de los datos obtenidos. Los círculos negros representan el valor medio de Ct de cada uno de los genes, mientras que la barra horizontal dentro de la caja roja corresponde al valor mediano de Ct. La barra horizontal final de la parte superior e inferior de cada caja indica los valores máximo y mínimo de Ct. Los círculos blancos representan valores de Ct *outliers*, es decir, los que superan 1,5 veces la distancia entre los cuartiles primero y tercero. Los triángulos invertidos señalan los genes que presentan valores *outliers*.

**Tabla 29:** medianas de expresión de los 10 genes (14 sondas) estudiados en este trabajo empleando como calibrador externo RNA de la población de próstatas normales.

<b>Parámetro</b>	<b>Mediana de expresión (mínimo- máximo)</b>
<i>TMPRSS2</i> exón 2,3	2,002 (0,0005-62,68)
<i>TMPRSS2</i> exón 7,8	2,34 ( $5,69 \cdot 10^{-8}$ -22,94)
<i>ERG</i> exón 1,2	0,247 (0,02-19,92)
<i>ERG</i> exón 9,10	1,791 (0,011-151,51)
<i>ETV1</i> exón 1-3	0,646 (0,014-143763,04)
<i>ETV1</i> exón 5,6	0,316 (0,003-34,29)
<i>ETV4</i> exón 2,3	0,445 (0,004-1593,88)
<i>ETV4</i> exón 10,11	0,433 (0,001-29,65)
<i>PCA3</i>	43,411 (0,091-1209,33)
<i>HEPSIN</i>	4,97 (0,01-544,95)
<i>PAR-2</i>	0,636 (0,018-544,95)
<i>GSTP-1</i>	0,361 (0,0003-84,44)
<i>AMACR</i>	3,237 (0,005-572,05)
<i>Cav-1</i>	0,612 (0,002-13,44)

## RESULTADOS

En el análisis de la relación entre la presencia del gen de fusión y la expresión de estos genes obtenemos los siguientes resultados. (Tabla 30).

**Tabla 30:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de los genes estudiados y la presencia de *TMPRSS2-ERG*.

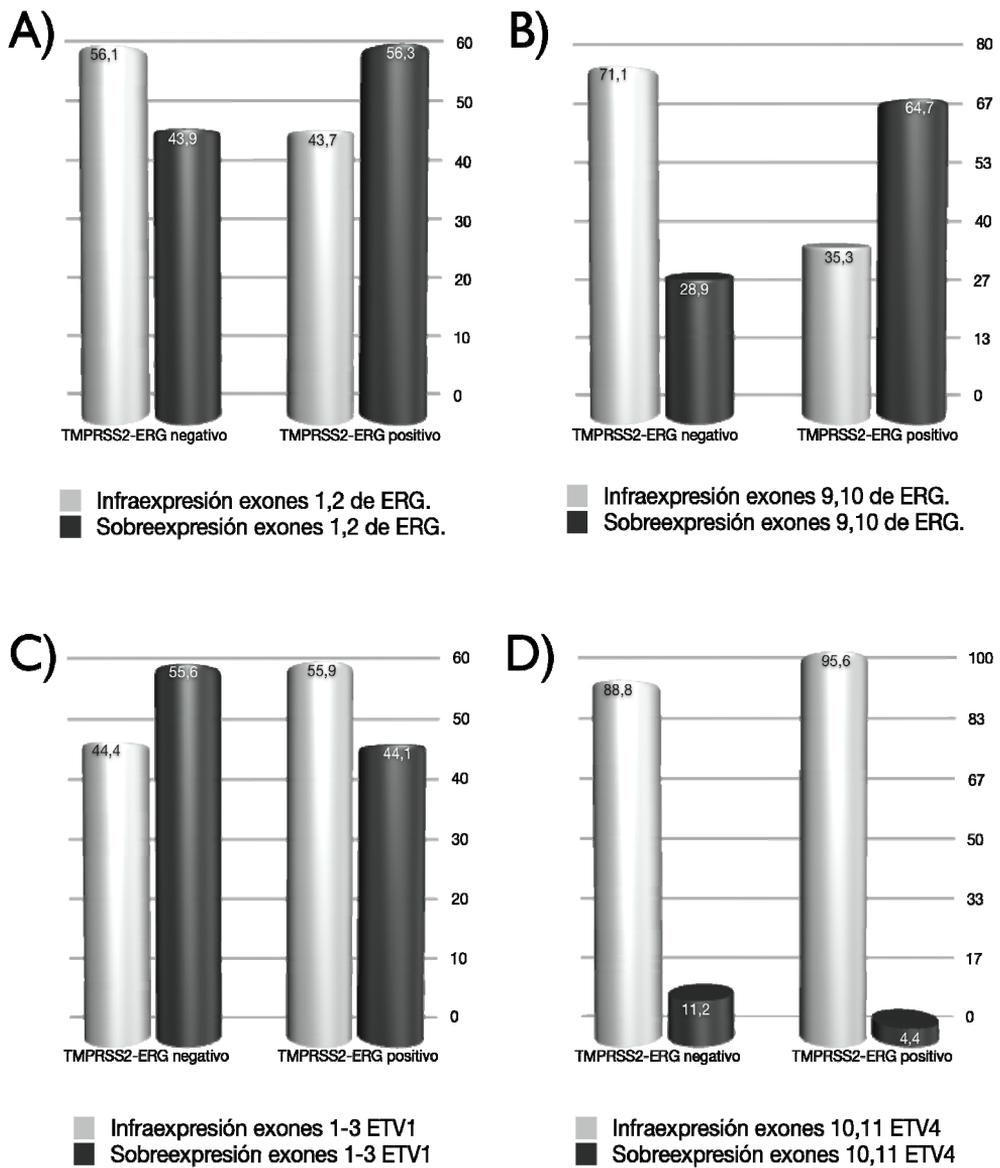
Parámetros	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> positivo	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	81 (49,3%) 83 (50,6%)	73 (50,7%) 71 (49,4%)	0,455
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	84 (50%) 84 (50%)	73 (50,3%) 72 (49,7%)	0,521
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	60 (56,1%) 47 (43,9%)	45 (43,7%) 58 (56,3%)	<b>0,049</b>
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	59 (71,1%) 24 (28,9%)	42 (35,3%) 77 (64,7%)	<b>&lt; 0,001</b>
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	72 (44,4%) 90 (55,6%)	80 (55,9%) 63 (44,1%)	<b>0,029</b>
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	72 (46,1%) 84 (53,9%)	76 (53,9%) 65 (46,1%)	0,112
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	66 (51,2%) 63 (48,8%)	63 (49,6%) 64 (50,4%)	0,451
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	135 (88,8%) 17 (11,2%)	132 (95,6%) 6 (4,4%)	<b>0,025</b>

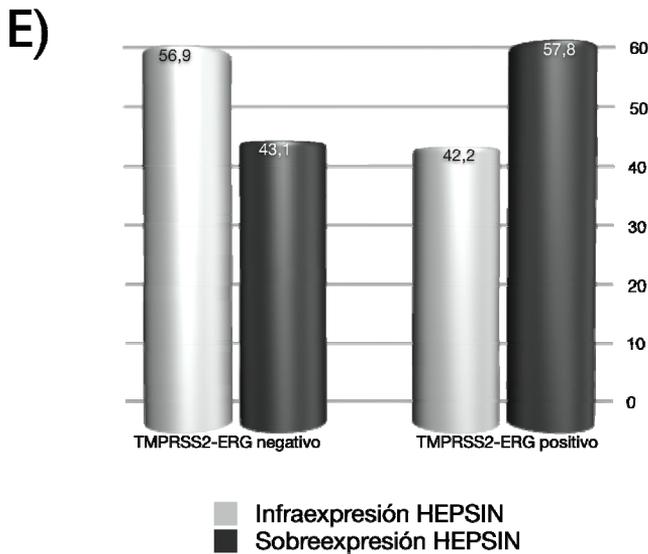
**Tabla 30 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de los genes estudiados y la presencia de *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> positivo	p
<b><i>PCA3</i></b> < mediana ≥ mediana	79 (50,6%) 77 (49,4%)	68 (48,9%) 71 (51,1%)	0,429
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	91 (56,9%) 69 (43,1%)	60 (42,2%) 82 (57,8%)	<b>0,008</b>
<b><i>PAR-2</i></b> < mediana ≥ mediana	69 (48,6%) 73 (51,4%)	68 (51,5%) 64 (48,5%)	0,358
<b><i>GSTP-1</i></b> < mediana ≥ mediana	86 (53,7%) 74 (46,3%)	65 (45,8%) 77 (54,2%)	0,102
<b><i>AMACR</i></b> < mediana ≥ mediana	85 (51,8%) 79 (48,2%)	67 (47,2%) 75 (52,8%)	0,243
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	84 (50%) 84 (50%)	73 (50,3%) 72 (49,7%)	0,521

En la siguiente figura (33) aparecen representados los histogramas de las relaciones significativas.

## RESULTADOS





**Figura 33:** Relaciones significativas entre la presencia del gen de fusión y la expresión de A) los exones 1 y 2 de *ERG* ( $p=0,049$ ) B) los exones 9 y 10 de *ERG* ( $p<0,001$ ) C) los exones 1 y 3 de *ETV1* ( $p=0,029$ ) D) los exones 10 y 11 de *ETV4* ( $p=0,025$ ). E) *HEP SIN*. ( $p=0,008$ )

A la vista de estos resultados podemos extraer que aquellos casos con presencia del gen de fusión se caracterizan por la sobreexpresión de *ERG* (especialmente con sondas localizadas en la unión de los exones 9 y 10). Un 65% de los casos que presentan *TMPRSS2-ERG* sobreexpresan los exones 9 y 10 de *ERG* frente a un 29% de sobreexpresión en los demás casos ( $p<0,001$ ). *HEP SIN* muestra un comportamiento similar (aproximadamente un 58% de los casos reordenados muestran sobreexpresión frente a un 43% de los casos que no expresan el gen de fusión  $p=0,008$ ).

Por otro lado es característica la infraexpresión de *ETV1* y *ETV4* en los casos portadores del gen de fusión. Concretamente un 44% de los casos translocados sobreexpresan *ETV1* frente a un 56% de los casos no reordenados ( $p=0,029$ ). En el caso de *ETV4* hay un sobreexpresión del 4% de los casos reordenados frente al 11% de casos que no lo están ( $p=0,025$ ).

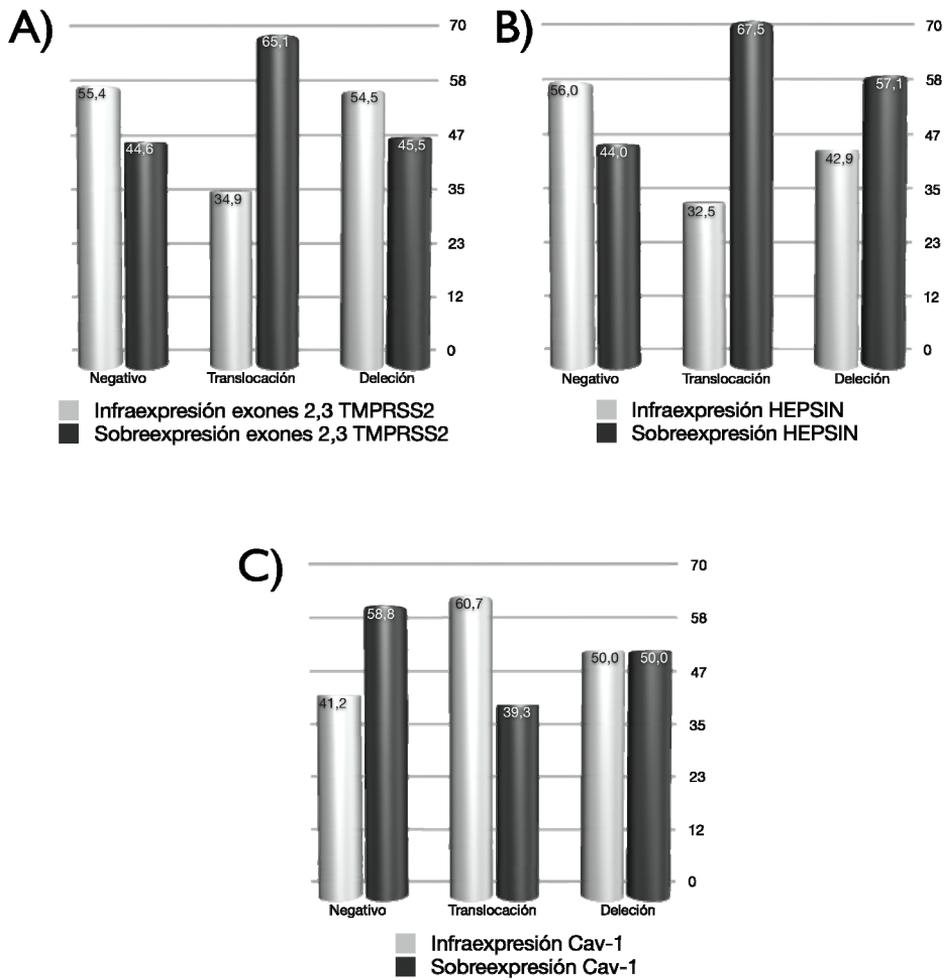
También se evidencian las relaciones entre el mecanismo de reordenamiento y la expresión génica. Concretamente la sobreexpresión de los *TMPRSS2* (en su porción proximal entre los exones 2 y 3) y de *HEP SIN* están relacionadas con la fusión con un patrón por *Break*, mientras que la infraexpresión de *Cav-1* correlaciona con delección intersticial. Tabla 31.

## RESULTADOS

**Tabla 31:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de los genes estudiados y el mecanismo de reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> Break	<i>TMPRSS2-ERG</i> delección	P
<b><i>TMPRSS2</i></b> exón 2,3 < mediana ≥ mediana	46 (55,4%) 37 (44,6%)	29 (34,9%) 54 (65,1%)	12 (54,5%) 10 (45,5%)	<b>0,021</b>
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	43 (54,4%) 36 (45,6%)	27 (32,5%) 56 (67,5%)	9 (42,9%) 12 (57,1%)	<b>0,019</b>
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	35 (41,2%) 50 (58,8%)	51 (60,7%) 33 (39,3%)	11 (50%) 11 (50%)	<b>0,04</b>

En la figura 34 aparecen representadas estas relaciones significativas entre el mecanismo de reordenamiento y la expresión de estos 3 genes.



**Figura 34:** representación mediante gráficos de barras de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y el mecanismo de reordenamiento *TMPRSS2-ERG*. A) exones 2 y 3 de *TMPRSS2* ( $p=0,021$ ) B) *HEPSIN* ( $p=0,019$ ) C) *Cav-1* ( $p=0,04$ ).

**4.1.5.1.- Asociación de la expresión génica con los parámetros clinicopatológicos.**

Para el análisis de la relación entre los PCP y la expresión de los genes se usa el test estadístico de Chi cuadrado para comparar variables categóricas y las correlaciones se miden con la prueba de Spearman.

**4.1.5.1.1- Concentración sérica de PSA en el diagnóstico.**

Las relaciones entre la concentración sérica de PSA y la expresión de los genes estudiados se esquematizan en la tabla 32 y la figura 35.

**Tabla 32:** test de chi cuadrado relacionando la concentración sérica de PSA en el diagnóstico con la expresión de los genes estudiados.

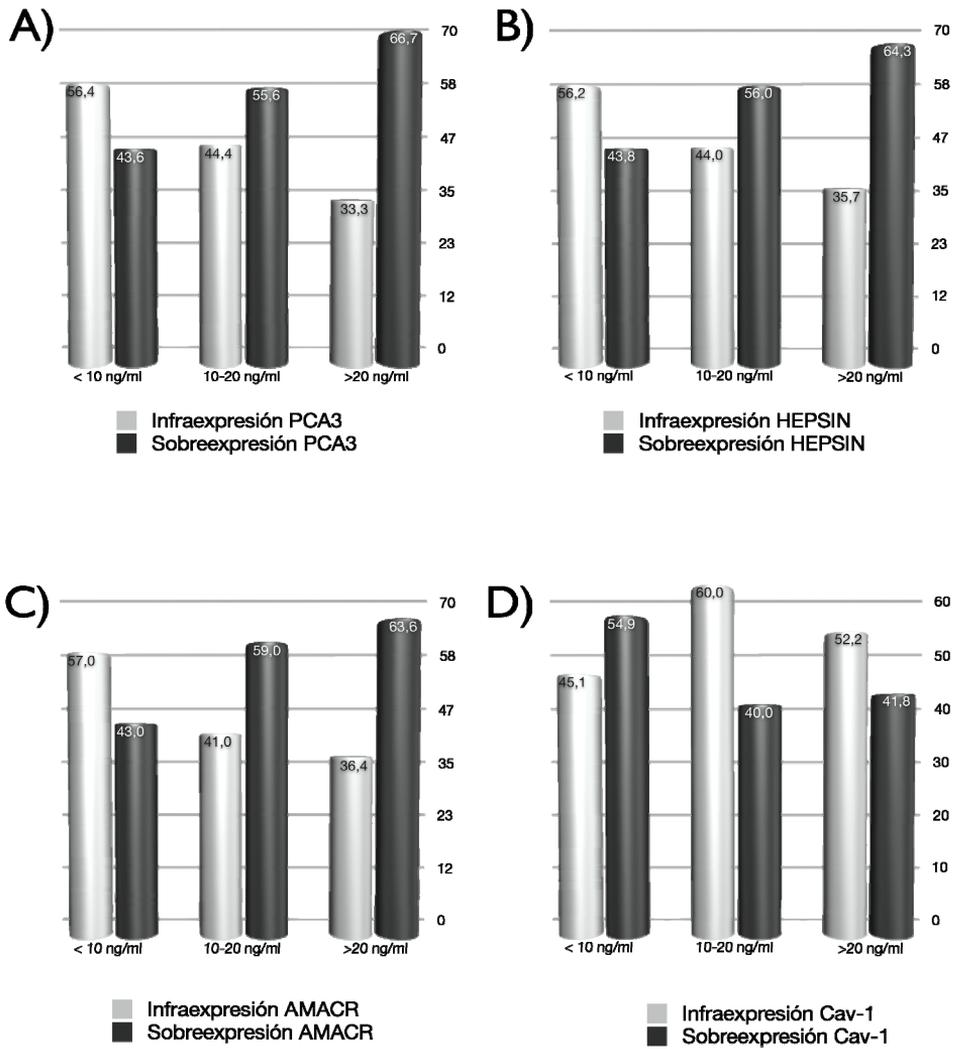
Genes	[PSA] < 10 ng/ml	[PSA] 10-20 ng/ml	[PSA] > 20 ng/ml	p
<b>TMPRSS2 exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	91 (50,8%) 88 (49,2%)	45 (52,9%) 40 (47,1%)	18 (40,9%) 26 (59,1%)	0,407
<b>TMPRSS2 exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	96 (52,4%) 87 (47,6%)	45 (52,3%) 41 (47,7%)	16 (36,4%) 28 (63,6%)	0,142
<b>ERG exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	64 (51,6%) 60 (48,4%)	27 (44,3%) 34 (55,7%)	14 (50%) 14 (50%)	0,524
<b>ERG exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	64 (63,4%) 56 (36,6%)	23 (42,6%) 31 (57,4%)	14 (50%) 14 (50%)	0,423
<b>ETVI exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	84 (47,4%) 93 (52,6%)	47 (55,3%) 38 (44,7%)	21 (48,8%) 22 (51,2%)	0,489
<b>ETVI exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	77 (44,8%) 95 (55,2%)	44 (53%) 39 (47%)	27 (64,3%) 15 (35,7%)	0,061

**Tabla 32 (cont.):** test de chi cuadrado relacionando la concentración sérica de PSA en el diagnóstico con la expresión de los genes estudiados.

Genes	[PSA] < 10 ng/ml	[PSA] 10-20 ng/ml	[PSA] > 20 ng/ml	p
<b>ETV4 exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	70 (47%) 79 (53%)	41 (57%) 31 (43%)	18 (51,4%) 17 (48,6%)	0,378
<b>ETV4 exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	153 (90,5%) 16 (9,5%)	78 (95,1%) 4 (4,9%)	36 (92,3%) 3 (7,7%)	0,450
<b>PCA3</b> < mediana ≥ mediana	97 (56,4%) 75 (43,6%)	36 (44,4%) 45 (55,6%)	14 (33,3%) 28 (66,7%)	<b>0,014</b>
<b>HEPSIN</b> < mediana ≥ mediana	100 (56,2%) 78 (43,8%)	36 (44%) 46 (56%)	15 (35,7%) 27 (64,3%)	<b>0,025</b>
<b>PAR-2</b> < mediana ≥ mediana	85 (52,8%) 76 (47,2%)	39 (50,6%) 38 (49,4%)	13 (36,1%) 23 (63,9%)	0,193
<b>GSTP-1</b> < mediana ≥ mediana	86 (48%) 93 (52%)	40 (49,4%) 41 (50,6%)	25 (59,5%) 17 (40,5%)	0,405
<b>AMACR</b> < mediana ≥ mediana	102 (57%) 77 (43%)	34 (41%) 49 (59%)	16 (36,4%) 28 (63,6%)	<b>0,009</b>
<b>Cav-1</b> < mediana ≥ mediana	83 (45,1%) 101 (54,9%)	51 (60%) 34 (40%)	23 (52,2%) 21 (41,8%)	<b>0,049</b>

Estos resultados ponen de manifiesto la relación directa entre los niveles séricos de PSA y la sobreexpresión de los genes: *PCA3*, *HEPSIN* y *AMACR*. De hecho, un 67% de los casos que expresen *PCA3* tienen una concentración inicial de PSA > 20 ng/ml frente a un 56% y un 44% característicos de casos con una concentración menor de PSA según los intervalos propuestos respectivamente ( $p=0,014$ ). En el caso de *HEPSIN* un 64% de los casos con concentración de PSA > 20 ng/ml lo sobreexpresan frente a un 56% y un 44% de sobreexpresión para concentraciones menores de PSA ( $p=0,025$ ). Un 64% de casos sobreexpresan *AMACR* con PSA > 20 ng/ml frente a un 59% y un 43% para menores concentraciones de PSA ( $p=0,009$ ).

Asimismo, una infraexpresión de *Cav-1* caracteriza a los casos con niveles séricos de PSA más elevados. Con un 42% de los casos sobreexpresando este gen en este grupo frente a un 40% y un 50% para casos con una concentración de PSA de entre 10-20 ng/ml y <10 ng/ml respectivamente ( $p=0,049$ ) Tabla 32 y la Figura 35 muestra los histogramas de estas 3 relaciones estadísticamente significativas.



**Figura 35:** representación mediante gráficos de barras de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y la concentración sérica inicial de PSA. A) *PCA3* ( $p=0,014$ ) B) *HEPSIN* ( $p=0,025$ ). C) *AMACR* ( $p=0,009$ ) D) *Cav-1* ( $p=0,049$ ).

## RESULTADOS

### 4.1.5.1.2- Estadio de Gleason.

En la siguiente tabla se reflejan los resultados obtenidos en el test de chi cuadrado buscando poner de manifiesto las relaciones estadísticamente significativas entre el estadio de Gleason y la expresión de los 10 genes estudiados.

**Tabla 33:** test de chi cuadrado relacionando el score de Gleason con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Gleason 2-6	Gleason 7	Gleason 8-10	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	66 (49,6%) 67 (50,4%)	69 (49,3%) 71 (50,7%)	19 (55,8%) 15 (44,2%)	0,763
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	67 (49,3%) 69 (50,7%)	73 (51%) 70 (49%)	17 (50%) 17 (50%)	0,956
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	49 (49,5%) 50 (50,5%)	46 (50,5%) 45 (49,5%)	10 (50%) 10 (50%)	0,990
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	51 (52,6%) 46 (47,4%)	43 (48,3%) 47 (51,7%)	7 (46,6%) 8 (53,4%)	0,778
<b><i>ETVI</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	62 (47,7%) 68 (52,3%)	74 (45,7%) 68 (54,3%)	16 (48,4%) 17 (51,6%)	0,757
<b><i>ETVI</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	60 (47,2%) 67 (52,8%)	71 (51,1%) 68 (48,9%)	17 (54,9%) 14 (45,1%)	0,692
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	55 (47%) 62 (53%)	59 (52,2%) 54 (47,8%)	15 (57,7%) 11 (42,3%)	0,538
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	113 (90,4%) 12 (9,6%)	125 (92,6%) 10 (7,4%)	29 (96,6%) 1 (3,4%)	0,498

**Tabla 33 (cont.):** test de chi cuadrado relacionando el score de Gleason con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Gleason 2-6	Gleason 7	Gleason 8-10	p
<b><i>PCA3</i></b> < mediana ≥ mediana	63 (48,8%) 66 (51,2%)	62 (45,9%) 73 (54,1%)	22 (70,9%) 9 (29,1%)	<b>0,04</b>
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	79 (60,3%) 52 (39,7%)	58 (41,7%) 81 (38,3%)	14 (43,7%) 18 (56,3%)	<b>0,007</b>
<b><i>PAR-2</i></b> < mediana ≥ mediana	59 (48,3%) 63 (51,7%)	63 (51,2%) 60 (48,8%)	15 (51,7%) 14 (48,3%)	0,887
<b><i>GSTP-1</i></b> < mediana ≥ mediana	58 (44,6%) 72 (55,4%)	68 (48,2%) 73 (51,8%)	15 (46,9%) 17 (53,1%)	0,177
<b><i>AMACR</i></b> < mediana ≥ mediana	68 (51,9%) 63 (48,1%)	68 (48,2%) 73 (51,8%)	16 (47%) 18 (53%)	0,789
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	58 (42,6%) 78 (57,4%)	82 (57,3%) 61 (42,7%)	17 (50%) 17 (50%)	<b>0,049</b>

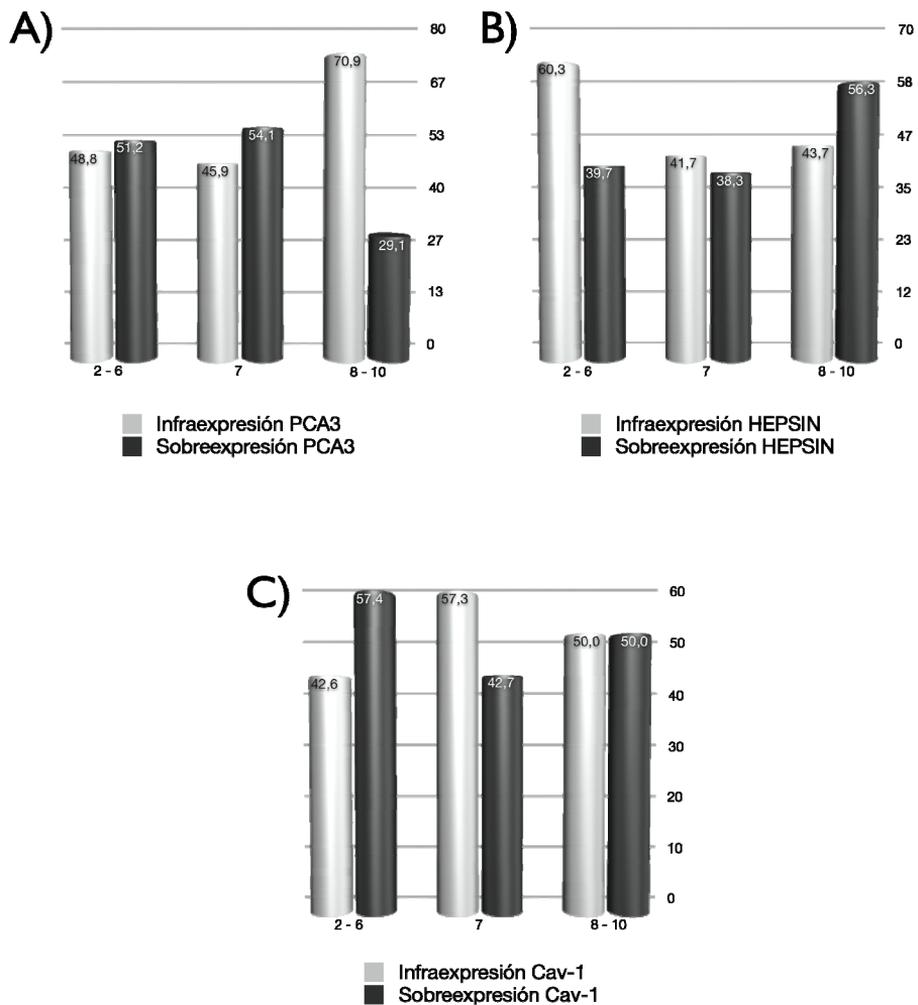
A la vista de estos resultados, es característica una sobreexpresión de *PCA3* en el Gleason 7 con una sobreexpresión del 54% de los casos en este grado frente a la sobreexpresión del 51% y del 29% de los casos entre 2-6 y entre 8-10 respectivamente (p=0,04).

La expresión de *HEPSIN* está directamente relacionada con el *score* de Gleason con un 56% de sobreexpresión en los casos con un estadio entre 8 y 10 frente a un 40% y un 38% característicos en estadios inferiores (p=0,007).

Por otro lado, la expresión de *Cav-1* está inversamente relacionada con este *score*, un 57% de los casos con estadios de Gleason entre 2 y 6 sobreexpresa este gen frente a un 43% y 50% de sobreexpresión característicos de estadios superiores

## RESULTADOS

( $p=0,049$ ). En la figura 36 muestran los histogramas de estas relaciones estadísticamente significativas.



**Figura 36:** representación mediante gráficos de barras de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y el estadio de Gleason. A) *PCA3* ( $p=0,04$ ) B) *HEPSIN* ( $p=0,07$ ) C) *Cav-1* ( $p=0,049$ ).

**4.1.5.1.3- Estadio clínico.**

En la tabla 34 están resumidas las relaciones estadísticamente significativas objetivadas entre el cT y las medianas de expresión génica.

**Tabla 34:** test de chi cuadrado relacionando el estadio clínico (cT) con la expresión de los genes estudiados.

Genes	≤ cT2c	≥ cT3a	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	142 (49,8%) 143 (50,2%)	12 (52,2%) 11 (47,8%)	0,500
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	150 (51,7%) 140 (48,3%)	7 (30,4%) 16 (69,6%)	<b>0,039</b>
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	98 (51%) 94 (49%)	7 (38,9%) 11 (61,1%)	0,230
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	98 (52,7%) 88 (47,3%)	3 (18,7%) 13 (81,3%)	<b>0,008</b>
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	140 (49,7%) 142 (50,3%)	12 (52,2%) 11 (47,8%)	0,493
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	137 (50%) 137 (50%)	11 (47,8%) 12 (52,2%)	0,507
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	117 (58,9%) 122 (41,1%)	12 (70,6%) 5 (69,4%)	0,069
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	247 (91,8%) 22 (8,2%)	20 (95,2%) 1 (4,8%)	0,488

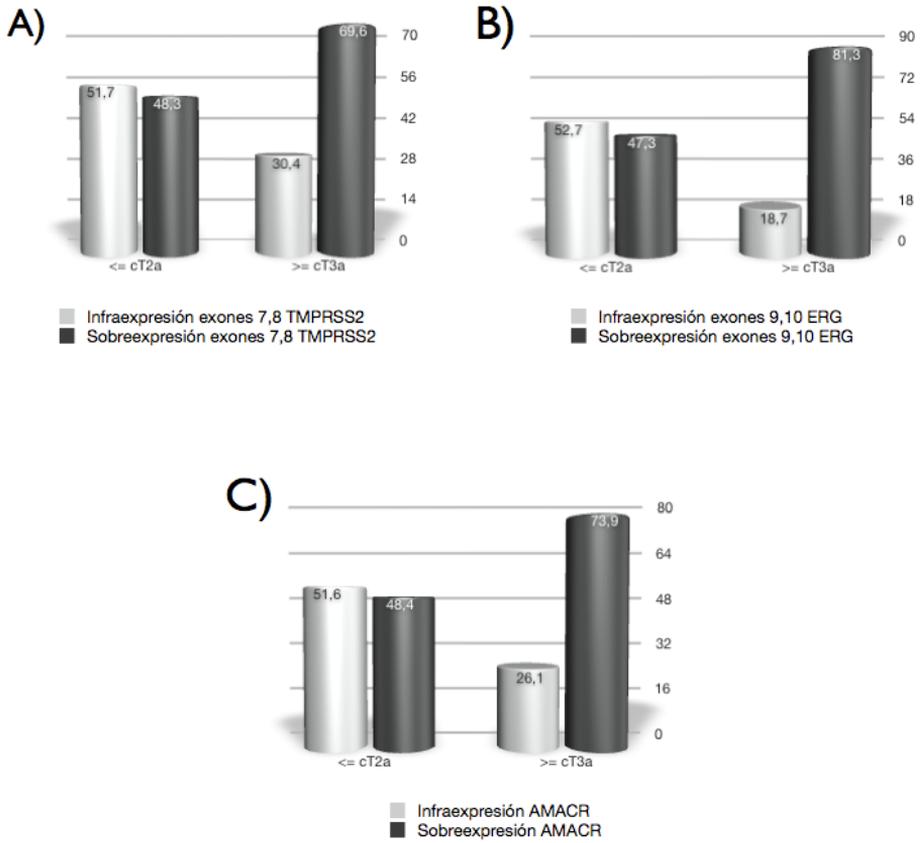
## RESULTADOS

**Tabla 34 (cont.):** test de chi cuadrado relacionando el estadio clínico (cT) con la expresión de los genes estudiados.

Genes	≤ cT2a	≥ cT3a	p
<b>PCA3</b> < mediana ≥ mediana	136 (50%) 136 (50%)	11 (47,8%) 12 (52,2%)	0,507
<b>HEPSIN</b> < mediana ≥ mediana	142 (50,9%) 137 (49,1%)	9 (39,1%) 14 (60,9%)	0,193
<b>PAR-2</b> < mediana ≥ mediana	125 (49,4%) 128 (50,6%)	12 (57,1%) 9 (42,9%)	0,325
<b>GSTP-1</b> < mediana ≥ mediana	137 (48,7%) 144 (51,3%)	14 (66,6%) 7 (33,4%)	0,087
<b>AMACR</b> < mediana ≥ mediana	146 (51,6%) 137 (48,4%)	6 (26,1%) 17 (73,9%)	<b>0,015</b>
<b>Cav-1</b> < mediana ≥ mediana	144 (49,6%) 146 (50,4%)	13 (56,5%) 10 (43,5%)	0,339

El análisis pone de manifiesto que los tumores prostáticos con un mayor estadio clínico muestran sobreexpresión de las regiones distales de *TMPRSS2* (exones 7 y 8) con un 70% de sobreexpresión en casos con estadio clínico mayor o igual que 3, frente un 48% de sobreexpresión en cT inferiores (p=0,039).

El 81% de los casos con cT $\geq$ 3a sobreexpresan los exones 9 y 10 de *ERG* frente al 47% de los casos con cT inferior que muestran una expresión superior a la mediana (p=0,008). También hay una relación directa entre la expresión de *AMACR* y el cT, con un 74% de casos sobreexpresados con cT elevado frente un 48% característico de cT $\leq$ 2a (Figura 37).



**Figura 37:** representación mediante gráficos de barras de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y cT. A) *TMPRSS2* ex 7,8 (p=0,039) B) *ERG* ex. 9,10 (p=0,008) C) *AMACR* (p=0,015).

**4.1.5.1.4- Estadio patológico.**

A continuación, en la tabla 35 aparecen los resultados del test de chi cuadrado que relaciona el estadio patológico y los valores de expresión génica.

**Tabla 35:** test de chi cuadrado relacionando el estadio patológico (pT) con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Órganoconfinado	Extraprostático	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	78 (48,1%) 84 (51,9%)	76 (52%) 70 (48%)	0,284
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	88 (53%) 78 (47%)	69 (46,9%) 78 (53,1%)	0,169
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	57 (54,3%) 48 (45,7%)	48 (45,7%) 57 (54,3%)	0,135
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	62 (59,6%) 42 (40,4%)	39 (39,8%) 59 (60,2%)	<b>0,004</b>
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	80 (50%) 80 (50%)	72 (49,6%) 73 (50,4%)	0,522
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	84 (53,8%) 72 (46,2%)	64 (45,4%) 77 (54,6%)	0,09
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	67 (48,5%) 71 (51,5%)	62 (52,5%) 56 (47,5%)	0,305

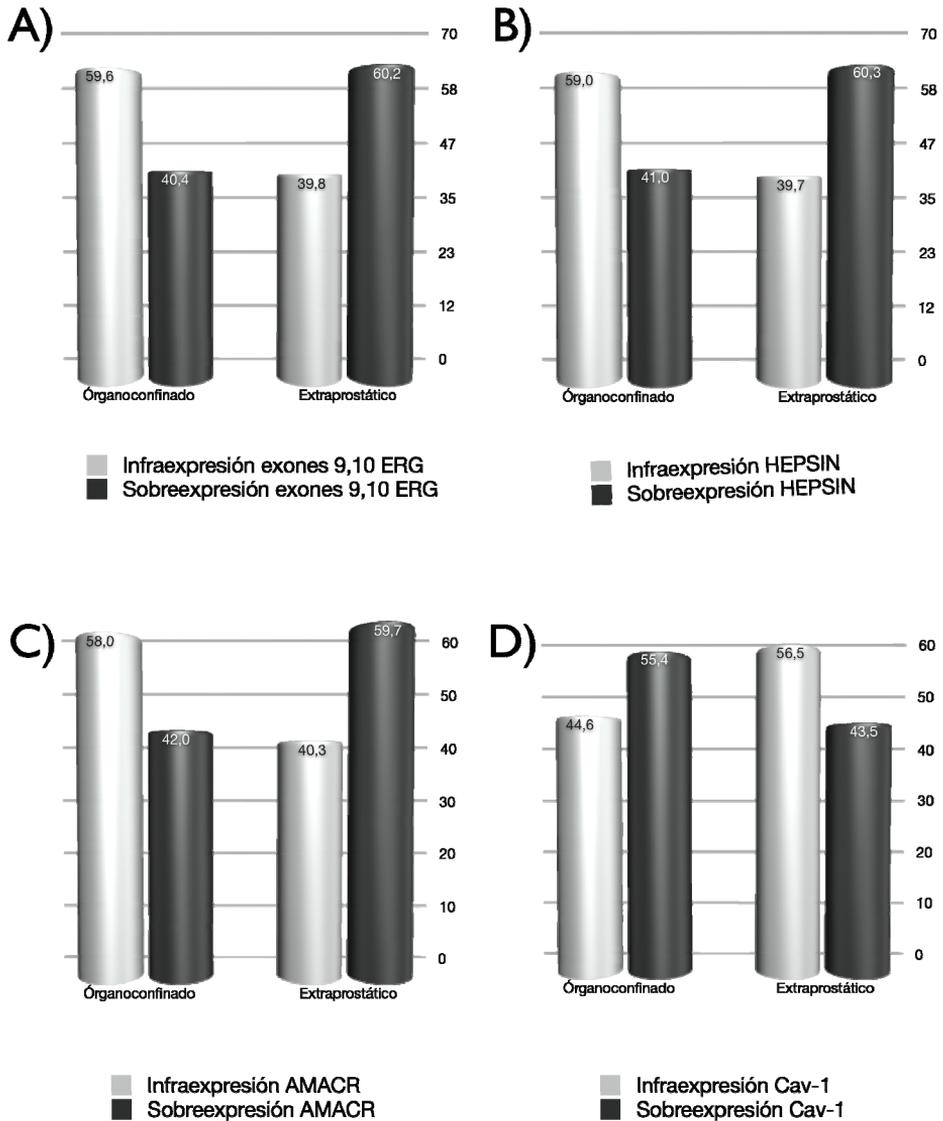
**Tabla 35 (cont.):** test de chi cuadrado relacionando el estadio patológico (pT) con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Órganoconfinado	Extraprostático	p
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	144 (92,9%) 11 (7,1%)	123 (91,1%) 12 (8,9%)	0,364
<b><i>PCA3</i></b> < mediana ≥ mediana	85 (54,5%) 71 (45,5%)	62 (44,6%) 77 (55,4%)	0,057
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	95 (59%) 66 (41%)	56 (39,7%) 85 (60,3%)	<b>0,001</b>
<b><i>PAR-2</i></b> < mediana ≥ mediana	74 (45,4%) 69 (54,6%)	63 (48,1%) 68 (51,9%)	0,314
<b><i>GSTP-1</i></b> < mediana ≥ mediana	74 (46,5%) 85 (53,5%)	77 (53,8%) 66 (46,2%)	0,125
<b><i>AMACR</i></b> < mediana ≥ mediana	94 (58%) 68 (42%)	58 (40,3%) 86 (59,7%)	<b>0,001</b>
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	74 (44,6%) 92 (55,4%)	83 (56,5%) 64 (43,5%)	<b>0,023</b>

El 60% de los casos extraprostáticos sobreexpresan los exones 9 y 10 de *ERG* frente al 40% de casos órganoconfinados ( $p=0,001$ ). La sobreexpresión de *HEPSIN* puede observarse en un 60% de los casos extraprostáticos y en un 41% de los órganoconfinados ( $p=0,001$ ) de la misma forma que *AMACR* presenta sobreexpresión en el 60% de los casos extraprostáticos frente a un 40% de los casos órganoconfinados ( $p=0,001$ ).

## RESULTADOS

Por el contrario esta relación es inversa con la expresión de *Cav-1*, de modo que un 55% de los casos órganoconfinados muestran una expresión de este gen superior a la mediana frente a un 43% de los casos extraprostáticos. (Figura 38).



**Figura 38:** representación mediante histogramas de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y pT. A) Exones 9, 10 de *ERG* ( $p=0,04$ ) B) *HEPSIN* ( $p=0,001$ ) C) *AMACR* ( $p=0,001$ ) D) *Cav-1* ( $p=0,023$ ).

4.1.5.1.5- PIN.

A continuación se encuentran tabulados los resultados de la relación estadística entre los valores de expresión génica y la presencia de la lesión precursora de CaP PIN. (Tabla 36).

**Tabla 36:** test de chi cuadrado relacionando la presencia de PIN con la expresión de los genes estudiados.

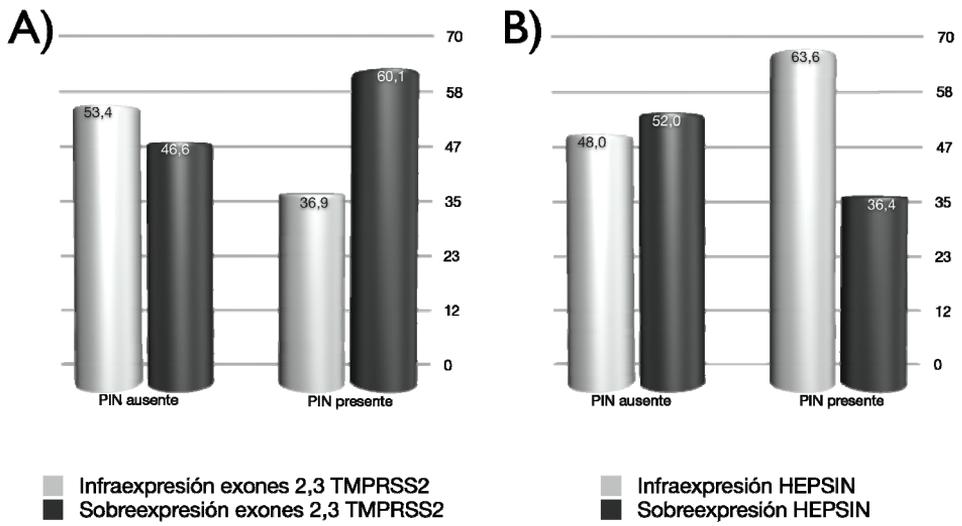
Genes	PIN ausente	PIN presente	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	125 (53,4%) 109 (46,6%)	17 (36,9%) 29 (60,1%)	<b>0,03</b>
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	131 (55%) 107 (45%)	19 (41,3%) 27 (39,7%)	0,061
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	85 (51,5%) 80 (48,5%)	11 (36,6%) 19 (63,4%)	0,097
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	81 (50,6%) 79 (49,4%)	16 (57,1%) 12 (42,9%)	0,334
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	120 (51,7%) 112 (48,3%)	20 (45,4%) 24 (54,6%)	0,275
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	112 (49,7%) 113 (50,3%)	21 (47,7%) 23 (52,3%)	0,467
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	102 (53,7%) 88 (46,3%)	17 (41,5%) 24 (58,5%)	0,106

## RESULTADOS

**Tabla 36 (cont.):** test de chi cuadrado relacionando la presencia de PIN con la expresión de los genes estudiados.

Genes	PIN ausente	PIN presente	p
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	201 (92,2%) 17 (7,8%)	40 (90,9%) 4 (9,1%)	0,483
<b><i>DD3</i></b> < mediana ≥ mediana	109 (48,2%) 117 (51,8%)	23 (54,8%) 19 (45,2%)	0,271
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	110 (48%) 119 (52%)	28 (63,6%) 16 (36,4%)	<b>0,041</b>
<b><i>PAR-2</i></b> < mediana ≥ mediana	106 (50,7%) 103 (49,3%)	18 (43,9%) 23 (56,1%)	0,266
<b><i>GSTP-1</i></b> < mediana ≥ mediana	120 (52,4%) 109 (47,6%)	17 (37,7%) 28 (62,3%)	0,051
<b><i>AMACR</i></b> < mediana ≥ mediana	111 (47,6%) 122 (52,4%)	25 (56,8%) 19 (43,2%)	0,170
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	123 (51,7%) 115 (48,3%)	19 (41,3%) 27 (38,7%)	0,130

La sobreexpresión de la región proximal de *TMPRSS2* (exones 1,2) está relacionada con la presencia de la lesión PIN con un 60% de los casos sobreexpresando el gen frente a un 46% de los casos que no portan PIN. Por otro lado, el gen *HEPSIN* se comporta de forma inversa con una sobreexpresión del 52% de los casos que presentan la lesión PIN ( $p=0,041$ ). (Figura 39).



**Figura 39:** representación mediante histogramas de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y PIN. A) *TMPRSS2* exón 2, 3 ( $p=0,03$ ) B) *HEPSIN* ( $p=0,041$ ).

**4.1.5.1.6- Infiltración perineural.**

En la siguiente tabla y figura se resumen las relaciones significativas relacionando la presencia de infiltración perineural con los datos de expresión génica. (Tabla 37 y en la figura 40).

**Tabla 37:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de infiltración perineural con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Ausente	Presente	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	68 (44,7%) 84 (55,3%)	84 (55,3%) 68 (44,7%)	<b>0,043</b>
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	72 (46,1%) 84 (53,9%)	83 (54,2%) 70 (45,8%)	0,095
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	46 (46,9%) 52 (53,1%)	58 (53,7%) 50 (46,3%)	0,203
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	52 (55,3%) 42 (44,7%)	47 (44,8%) 58 (55,2%)	0,089
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	70 (47%) 79 (53%)	80 (65,6%) 72 (44,4%)	0,193
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	71 (49,3%) 73 (50,7%)	74 (49,6%) 75 (50,4%)	0,522
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	53 (42,7%) 71 (57,3%)	73 (57%) 55 (43%)	<b>0,016</b>
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	127 (88,8%) 16 (11,2%)	137 (95,1%) 7 (4,9%)	<b>0,039</b>

**Tabla 37 (cont.):** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de infiltración perineural con la expresión de los genes estudiados.

Genes	Ausente	Presente	p
<b>PCA3</b> < mediana ≥ mediana	71 (48,6%) 75 (51,4%)	74 (50,7%) 72 (49,3%)	0,407
<b>HEPSIN</b> < mediana ≥ mediana	81 (55,1%) 66 (44,9%)	67 (44,4%) 84 (55,6%)	<b>0,041</b>
<b>PAR-2</b> < mediana ≥ mediana	57 (42,5%) 77 (57,5%)	78 (56,9%) 59 (43,1%)	<b>0,012</b>
<b>GSTP-1</b> < mediana ≥ mediana	63 (43,1%) 83 (56,9%)	84 (55,3%) 68 (44,7%)	<b>0,024</b>
<b>AMACR</b> < mediana ≥ mediana	73 (48,3%) 78 (51,7%)	77 (49%) 74 (51%)	0,365
<b>Cav-1</b> < mediana ≥ mediana	75 (47,7%) 82 (52,3%)	79 (52%) 73 (48%)	0,266

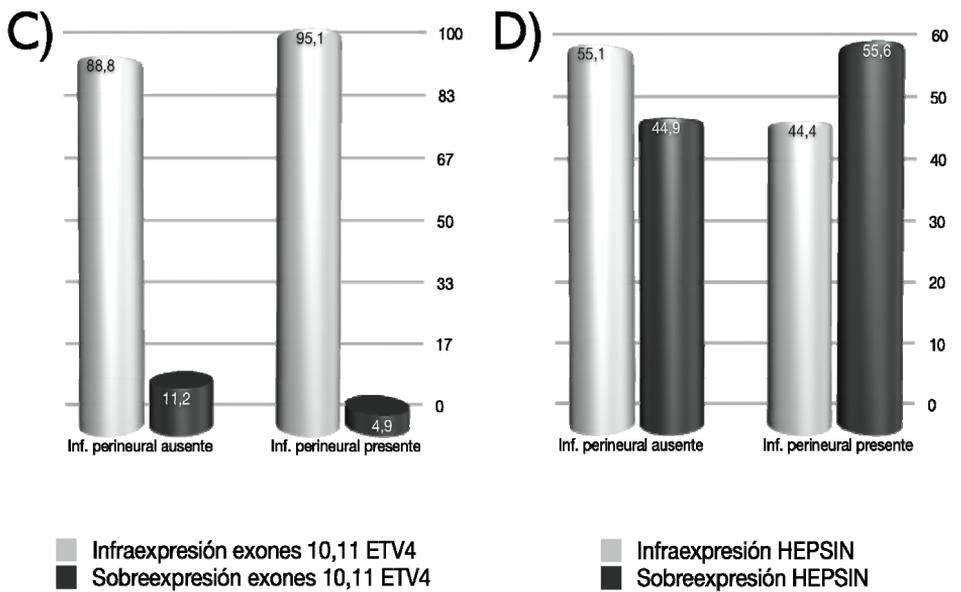
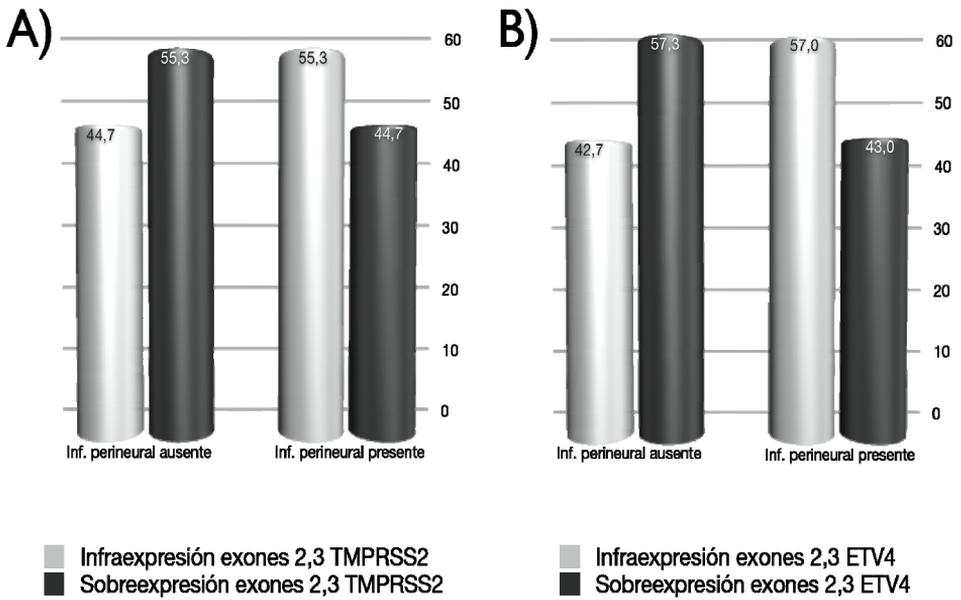
La presencia de infiltración perineural en las muestras tumorales está relacionada con infraexpresión de la región proximal de *TMPRSS2*, donde un 55% de los casos no infiltrados sobreexpresan los exones 2 y 3 de este gen, frente a un 45% de los casos infiltrados que muestran una expresión análoga ( $p=0,043$ ). También muestran este comportamiento los exones 2 y 3 de *ETV4* con un 57% de muestras sobreexpresadas carentes de infiltración perineural frente a un 43% de sobreexpresión en casos infiltrados ( $p=0,016$ ). Los casos que sobreexpresan los exones 10 y 11 de *ETV4* también carecen de infiltración perineural mayoritariamente (11% frente a 5%;  $p=0,039$ ). *PAR-2* y *GSTP-1* también muestran esta relación inversa estadísticamente significativa entre la infiltración perineural y su expresión; un 57% de los casos sobreexpresan cada uno de los genes sin presentar infiltración perineural frente a un 43% y un 45% respectivamente que

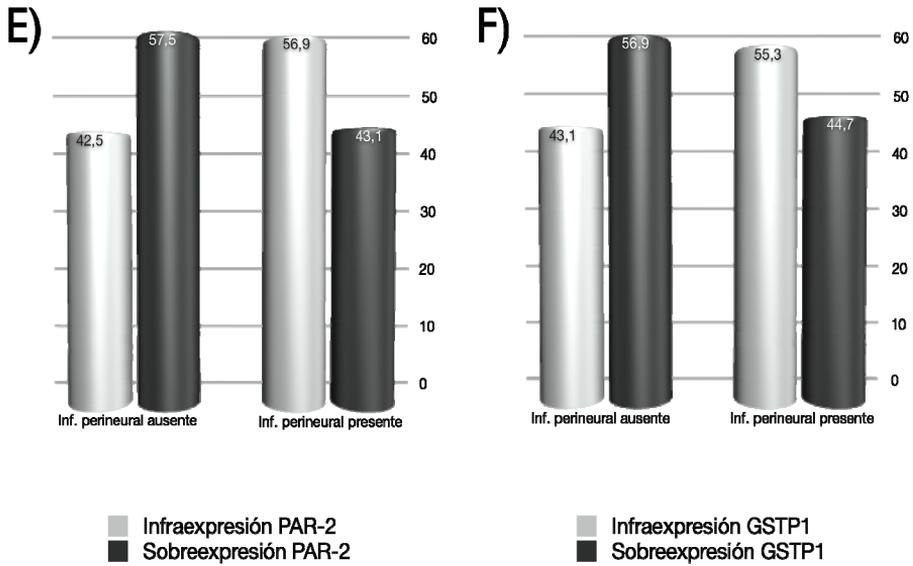
## RESULTADOS

---

sobreexpresan ambos genes y además están infiltrados ( $p=0,012$  y  $p=0,024$  respectivamente).

En el polo contrario se sitúa la expresión de *HEPSIN* cuya sobreexpresión en 56% de los casos con infiltración que contrasta con el 45% de los casos que sobreexpresan el mismo gen no presentando, además, infiltración perineural ( $p=0,041$ ).



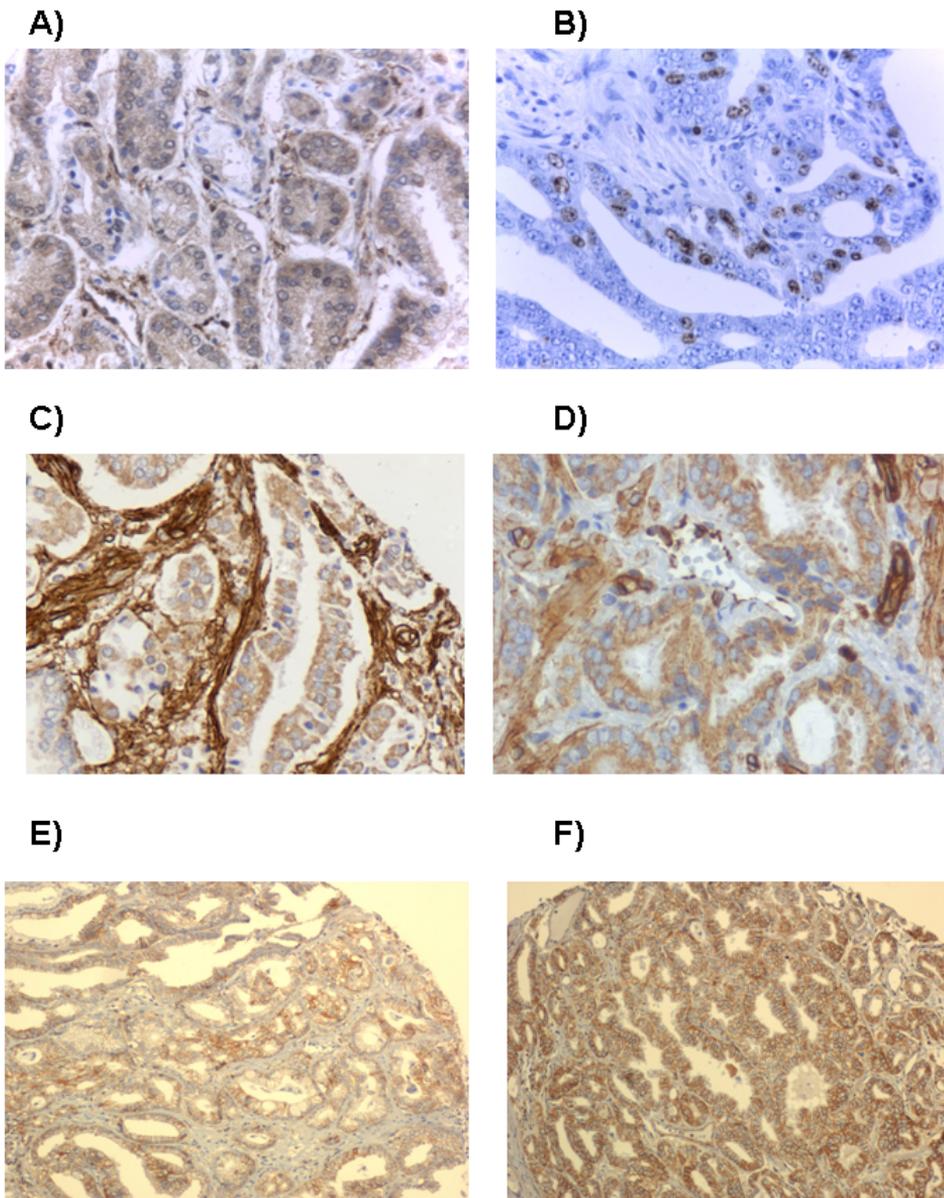


**Figura 40:** representación mediante histogramas de las relaciones significativas entre la expresión de los genes estudiados y la presencia de infiltración perineural. A) *TMPRSS2* exón 2, 3 ( $p=0,043$ ) B) *ETV4* exón 2, 3 ( $p=0,016$ ) C) *ETV4* exón 10,11 ( $p=0,039$ ) D) *HEPSIN* ( $p=0,041$ ) E) *PAR-2* ( $p=0,012$ ) F) *GSTP-1* ( $p=0,024$ ).

#### **4.1.6.- Análisis de la expresión proteica.**

Los 314 CaP incluidos en esta serie se incluyeron en 19 TMAs sobre los que se analizó la expresión de las proteínas PTEN, Ki67, Caveolina-1 (usando dos anticuerpos distintos, uno de Santa Cruz y otro de BD), CD-99 y TPD52. En la tabla 38 se describen las frecuencias de los parámetros de expresión en esta serie, así como el número de casos válidos y de TMAs valorados.

En la figura 41 se pueden apreciar ejemplos de las tinciones IHQ de los marcadores proteicos estudiados en la presente tesis.



**Figura 41:** Imágenes del análisis IHQ de las proteínas analizadas. A) Pérdida de expresión de PTEN, en el estroma adyacente se aprecia la proteína con expresión conservada (200X) B) Hiperexpresión de Ki67 (200X).C) Caso positivo con el ac SC Cav-1 (200X). D) Elevada expresión proteica de Cav-1 con el ac BD (200X) E ) Expresión baja de CD-99 (400X). F) Elevada expresión proteica de CD99 (400X).

**Tabla 38:** frecuencias de la expresión inmunohistoquímica de las 5 proteínas estudiadas en este trabajo\*

<b>Parámetro</b>	<b>n (%)</b>	<b>Casos válidos</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	112 (51,4) 106 (48,6)	218
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	195 (77,4) 57 (22,6)	252
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	7 (3,2) 208 (96,8)	215
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	174 (78,7) 47 (21,3)	221
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	19 (8,8) 197 (91,2)	216
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	3 (1,4) 215 (98,6)	218

\* Las frecuencias se refieren al número de casos valorables.

**4.1.6.1 Asociación de los parámetros inmunohistoquímicos con la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.**

Tal y como se muestra en la tabla 39 no se apreció ningún tipo de asociación entre la presencia del gen de fusión con las proteínas analizadas a nivel inmunohistoquímico.

**Tabla 39:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de las proteínas estudiadas y la presencia de *TMPRSS2-ERG*.

	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> positivo	p
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	53 (52%) 49 (48%)	59 (50,9%) 57 (49,1%)	0,490
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	94 (77%) 28 (23%)	101 (77,7%) 29 (22,3%)	0,511
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	3 (3%) 98 (97%)	4 (3,5%) 110 (96,5%)	0,567
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	81 (77,1%) 24 (22,9%)	93 (80,2%) 23 (19,8%)	0,350
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	11 (11,1%) 88 (88,9%)	8 (6,8%) 109 (93,2%)	0,194
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	1 (1,7%) 97 (99%)	2 (1,7%) 115 (98,3%)	0,566

Cuando se analizó la correlación entre el mecanismo de reordenamiento *TMPRSS2-ERG* con la expresión inmunohistoquímica tampoco se puso de manifiesto ninguna relación estadísticamente significativa.

#### **4.1.6.2- Asociación de la expresión proteica con los parámetros clinicopatológicos.**

A continuación se detallan el análisis por el test de chi cuadrado mediante tablas de contingencia entre la expresión de las proteínas y los PCP. En el caso de la Caveolina-1 se usaron dos ac distintos (uno de Santa Cruz y el otro de BD)

En las tablas 40 a 47 figuran las tablas de contingencia de la relación entre los PCP y la expresión de las proteínas estudiadas.

A nivel de PSA sólo se aprecian diferencias estadísticamente significativas con Cav-1 (ac SC) y TPD52. En el caso de la Cav-1 se observa una disminución de casos positivos a medida que aumentan los niveles séricos de PSA ( $p < 0,001$ ). (Figura 44). En el caso del TPD52 sólo hay 3 casos negativos para este marcador, todos ellos con niveles de PSA entre 10-20 ng/ml ( $p = 0,03$ ). (Tabla 40).

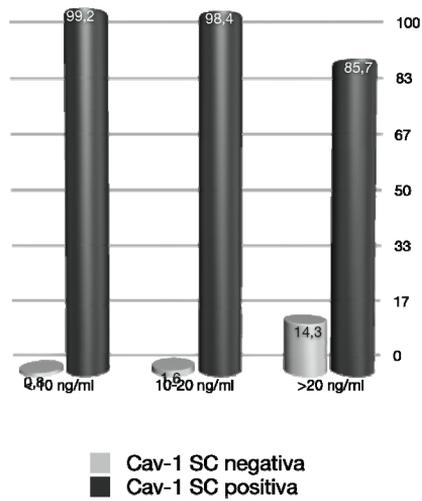
En la tabla 50, se aprecian asociaciones significativas de la progresión clínica con la expresión de Cav-1 (ac SC) de modo que el 99% de los casos con positividad para el ac SC de Cav-1 progresan frente al 91% que no lo hacen ( $p = 0,016$ ). Por otro lado aprecia relación de progresión clínica con la expresión de TPD52 mostrando esta proteína positividad en el 95% de los casos que progresan frente a un 100% en el resto (Tabla 47 y figura 42).

## RESULTADOS

---

**Tabla 40:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la concentración inicial de PSA con la expresión de las proteínas estudiadas.

Parámetros analizados	[PSA] < 10 ng/ml	[PSA] 10-20 ng/ml	[PSA] > 20 ng/ml	p
<b>PTEN</b>				
Negativo	68 (54,8%)	30 (50%)	14 (41,2%)	0,358
Positivo	56 (45,2%)	30 (50%)	20 (58,8%)	
<b>Ki67</b>				
Negativo	108 (76,6%)	57 (80,3%)	30 (75%)	0,771
Positivo	33 (23,4%)	14 (19,7%)	10 (25%)	
<b>Cav-1 SC</b>				
Negativo	1 (0,8%)	1 (1,6%)	5 (14,3%)	<b>&lt;0,001</b>
Positivo	115 (99,2%)	63 (98,4%)	30 (85,7%)	
<b>Cav-1 BD</b>				
Negativo	96 (80%)	50 (78,1%)	28 (75,7%)	0,845
Positivo	24 (20%)	14 (21,9%)	9 (24,3%)	
<b>CD-99</b>				
Negativo	11 (9,6%)	5 (7,7%)	3 (8,1%)	0,894
Positivo	103 (90,4%)	60 (92,3%)	34 (91,9%)	
<b>TPD52</b>				
Negativo	0 (0%)	3 (4,6%)	0 (0%)	<b>0,03</b>
Positivo	113 (100%)	62 (95,4%)	37 (100%)	



**Figura 43:** histograma representativo de la relación entre la expresión de Cav-1 y la concentración sérica de PSA.

## RESULTADOS

**Tabla 41:** test de chi cuadrado y estudio de asociación relacionando el estadio de Gleason con la expresión de las proteínas estudiadas.

Parámetros analizados	Estadio de Gleason 2-6	Estadio de Gleason 7	Estadio de Gleason 8-10	p
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	39 (45,3%) 47 (54,7%)	63 (57,8%) 46 (42,2%)	10 (43,5%) 13 (56,5%)	0,163
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	73 (76,8%) 22 (23,3%)	100 (78,1%) 28 (21,9%)	22 (75,8%) 7 (24,2%)	0,954
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	1 (1%) 98 (99%)	5 (5,4%) 88 (94,6%)	1 (4,3%) 22 (95,7%)	0,223
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	82 (65,1%) 24 (34,9%)	73 (44%) 93 (66%)	19 (86,4%) 3 (13,6%)	0,642
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	7 (6,9%) 94 (93,1%)	10 (11%) 82 (89%)	2 (8,7%) 21 (91,3%)	0,628
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	1 (1%) 99 (99%)	2 (3,2%) 90 (96,8%)	0 (0%) 23 (100%)	0.656

**Tabla 42:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando el cT con la expresión de las proteínas estudiadas.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>≤ cT2a</b>	<b>≥ cT3a</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	102 (50,7%) 99 (40,3%)	10 (58,8%) 7 (41,2%)	0,351
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	180 (77,2%) 53 (22,8%)	15 (78,9%) 4 (21,1%)	0,563
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	7 (3,5%) 193 (96,5%)	0 (0%) 15 (100%)	0,598
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	164 (80%) 41 (20%)	10 (62,5%) 6 (37,5%)	0,096
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	18 (89,5%) 183 (10,5%)	1 (6,6%) 14 (93,4%)	0,612
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	3 (1,5%) 197 (98,5%)	0 (0%) 15 (100%)	0,804

## RESULTADOS

---

**Tabla 43:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando el pT con la expresión de las proteínas estudiadas.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>Órganoconfinado</b>	<b>Extraprostático</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	59 (54,1%) 50 (45,9%)	53 (48,6%) 56 (51,4%)	0,249
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	100 (80,6%) 24 (19,4%)	95 (74,2%) 33 (25,8%)	0,143
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	1 (0,9%) 106 (99,1%)	6 (5,6%) 102 (94,4%)	0,061
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	91 (82%) 20 (18%)	83 (75,5%) 27 (24,5%)	0,154
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	8 (7,3%) 101 (92,7%)	11 (10,3%) 96 (89,7%)	0,301
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	1 (0,9%) 108 (99,1%)	2 (1,9%) 104 (98,1%)	0,489

**Tabla 44:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de la lesión precursora PIN con la expresión de las proteínas estudiadas.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>Ausente</b>	<b>Presente</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	93 (54,7%) 77 (45,3%)	14 (45,2%) 17 (54,8%)	0,216
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	152 (77,6%) 44 (22,4%)	24 (72,7%) 9 (27,3%)	0,341
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	6 (3,9%) 149 (96,1%)	0 (0%) 33 (100%)	0,309
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	128 (80%) 32 (20%)	29 (85,3%) 5 (14,7%)	0,328
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	10 (6,4%) 146 (93,6%)	5 (15,2%) 28 (84,8%)	0,096
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	2 (1,3%) 153 (98,7%)	0 (0%) 33 (100%)	0,679

## RESULTADOS

---

**Tabla 45:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de infiltración perineural con la expresión de las proteínas estudiadas.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>Ausente</b>	<b>Presente</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	46 (48,4%) 49 (51,6%)	63 (52,5%) 57 (47,5%)	0,324
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	85 (75,9%) 27 (24,1%)	108 (78,8%) 29 (21,2%)	0,344
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	3 (2,4%) 120 (97,6%)	4 (4,4%) 87 (93,6%)	0,338
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	97 (77,6%) 28 (22,4%)	74 (79,6%) 19 (19,4%)	0,429
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	10 (8,2%) 112 (91,8%)	9 (9,9%) 82 (90,1%)	0,423
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	2 (1,6%) 120 (98,4%)	1 (1,1%) 89 (98,9%)	0,613

**Tabla 46:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de progresión bioquímica con la expresión de las proteínas estudiadas.

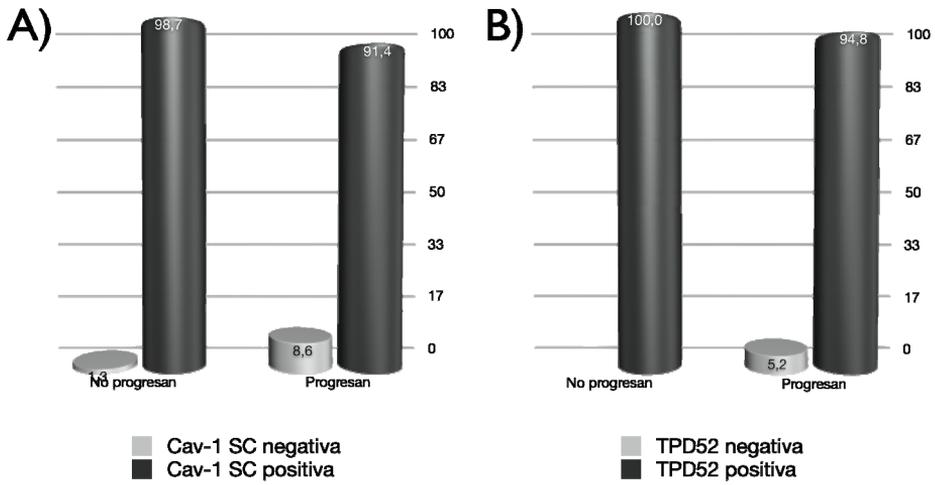
<b>Parámetros analizados</b>	<b>No progresan</b>	<b>Progresan</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	68 (54,4%) 57 (45,6%)	44 (47,3%) 49 (52,7%)	0,184
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	113 (79,6%) 29 (81,4%)	82 (74,5%) 28 (25,5%)	0,213
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	2 (1,7%) 116 (98,3%)	5 (5,1%) 92 (94,9%)	0,150
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	97 (79,5%) 25 (20,5%)	77 (77,7%) 22 (22,3%)	0,440
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	10 (8,5%) 108 (91,5%)	9 (9,2%) 89 (90,8%)	0,521
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	1 (0,8%) 116 (99,2%)	2 (2%) 96 (98%)	0,434

## RESULTADOS

**Tabla 47:** test de chi cuadrado con tablas cruzadas relacionando la presencia de progresión con la expresión de las proteínas estudiadas.

<b>Parámetros analizados</b>	<b>No progresan</b>	<b>Progresan</b>	<b>p</b>
<b>PTEN</b>			
Negativo	83 (50,3%)	29 (54,7%)	0,344
Positivo	82 (49,7%)	24 (45,3%)	
<b>Ki67</b>			
Negativo	148 (78,7%)	47 (73,4%)	0,240
Positivo	40 (21,3%)	17 (26,6%)	
<b>Cav-1 SC</b>			
Negativo	2 (1,3%)	5 (8,6%)	<b>0,016</b>
Positivo	155 (98,7%)	53 (91,4%)	
<b>Cav-1 BD</b>			
Negativo	126 (77,7%)	48 (81,3%)	0,354
Positivo	36 (22,3%)	11 (18,7%)	
<b>CD-99</b>			
Negativo	14 (8,9%)	5 (17,5%)	0,598
Positivo	144 (91,1%)	53 (82,5%)	
<b>TPD52</b>			
Negativo	0 (0%)	3 (5,2%)	<b>0,019</b>
Positivo	157 (100%)	55 (94,8%)	

En la siguiente figura (45) aparecen los histogramas representando las relaciones estadísticamente significativas entre la presencia de progresión clínica en el diagnóstico y la expresión de Cav-1, con el ac de SC, y TPD52.



**Figura 44:** representación mediante histogramas de las relaciones significativas entre la expresión de las proteínas y la progresión. A) Cav-1 SC B) TPD52.

#### 4.1.7.- Patrón de la expresión génica.

A continuación se exponen los resultados del análisis por clusters no supervisados de la expresión de los 10 genes analizados. A fin de estudiar posibles implicaciones pronósticas se relacionan los perfiles de expresión obtenidos con los PCP.

Los resultados de este análisis dividen nuestra población en 3 grupos según la expresión de los genes estudiados (Tabla 48 y figura 45).

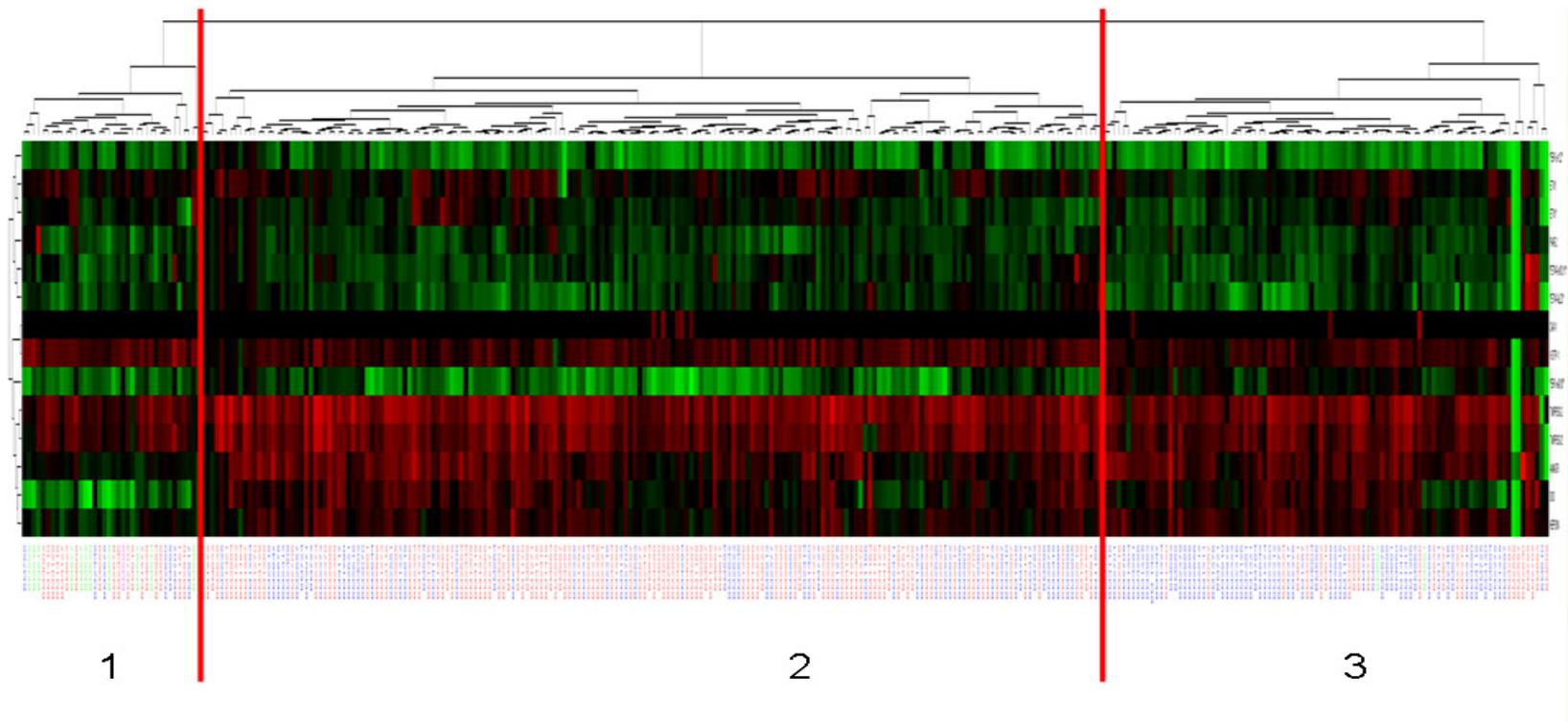
**Tabla 48:** frecuencias de los grupos de expresión obtenidos por análisis de clusters no supervisados.

	Número de casos	%
Grupo 1	37	11,4
Grupo 2	191	59,1
Grupo 3	95	29,4

El grupo 1 engloba 37 casos. En este grupo se encuentran todos los casos de tejido prostático normal usados como grupo calibrador en el análisis de expresión. También contiene 8 (32%) casos portadores de *TMPRSS2-ERG*. Todos los CaP tienen un estadio clínico menor o igual de 2a, 10 casos (41,7%) presentan localización extraprostática y 10 (41,7%) presentan infiltrados perineurales. En cuanto a la expresión génica característica; este grupo muestra sobreexpresado todo el gen *TMPRSS2* y *GSTP-1*.

El segundo grupo es el más numeroso con 191 casos, de los que 83 (43,7%) tienen el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*, Nueve (4,7%) presentan un cT  $\geq$  3a, y en cuanto a la extensión extraprostática 78 (44,1%) la presentan. Por último, 84 (44,9%) tienen infiltración perineural. Los genes *TMPRSS2*, *AMACR*, *PCA3* y *HEPSIN* muestran una notable sobreexpresión dentro de este clúster.

Por último, el tercer grupo comprende 95 casos, de los que 71 (76,3%) portan el gen de fusión. Trece (14%) presentan un cT  $\geq$  3a, 57 (61,3%) tienen extensión extraprostática y otros 57 (61,3%) infiltración perineural. La característica más apreciable en la expresión de los genes de este grupo es la sobreexpresión de *TMPRSS2*, *AMACR* y *HEPSIN*.



**Figura 45:** *Heat map* correspondiente al análisis por clusters no supervisados de las 309 muestras de la serie retrospectiva (9 muestras eliminadas por no ser válidas para el análisis).

En la siguiente tabla se detallan las relaciones de los grupos según los patrones de expresión y los PCP.

**Tabla 49:** relación entre los grupos de expresión y los PCP para la serie global \*

PCP	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	p
<b>PSA inicial</b>				
<10 ng/ml	18 (72%)	110 (57,9%)	53 (57%)	0,519
10-20 ng/ml	6 (24%)	50 (26,3%)	27 (29%)	
>20 ng/ml	1 (4%)	30 (15,8%)	13 (14%)	
<b>Score de Gleason</b>				
2-6	14 (56%)	79 (41,6%)	133 (43,2%)	0,587
7	8 (32%)	89 (46,8%)	142 (46,1%)	
8-10	3 (12%)	22 (11,6%)	33 (10,7%)	
<b>cT (estadio clínico)</b>				
≤cT2c	25 (100%)	181 (95,3%)	80 (86%)	<b>0,006</b>
≥cT3a	0 (0%)	9 (4,7%)	13 (14%)	
<b>pT (estadio patológico)</b>				
Órganoconfinado	16 (64%)	112 (58,9%)	36 (38,7%)	<b>0,003</b>
Extraprostático	9 (36%)	78 (41,1%)	57 (61,3%)	
<b>PIN</b>				
Ausencia	19 (82,6%)	143 (82,7%)	72 (86,7%)	0,697
Presencia	4 (17,4%)	30 (17,3%)	11 (13,3%)	

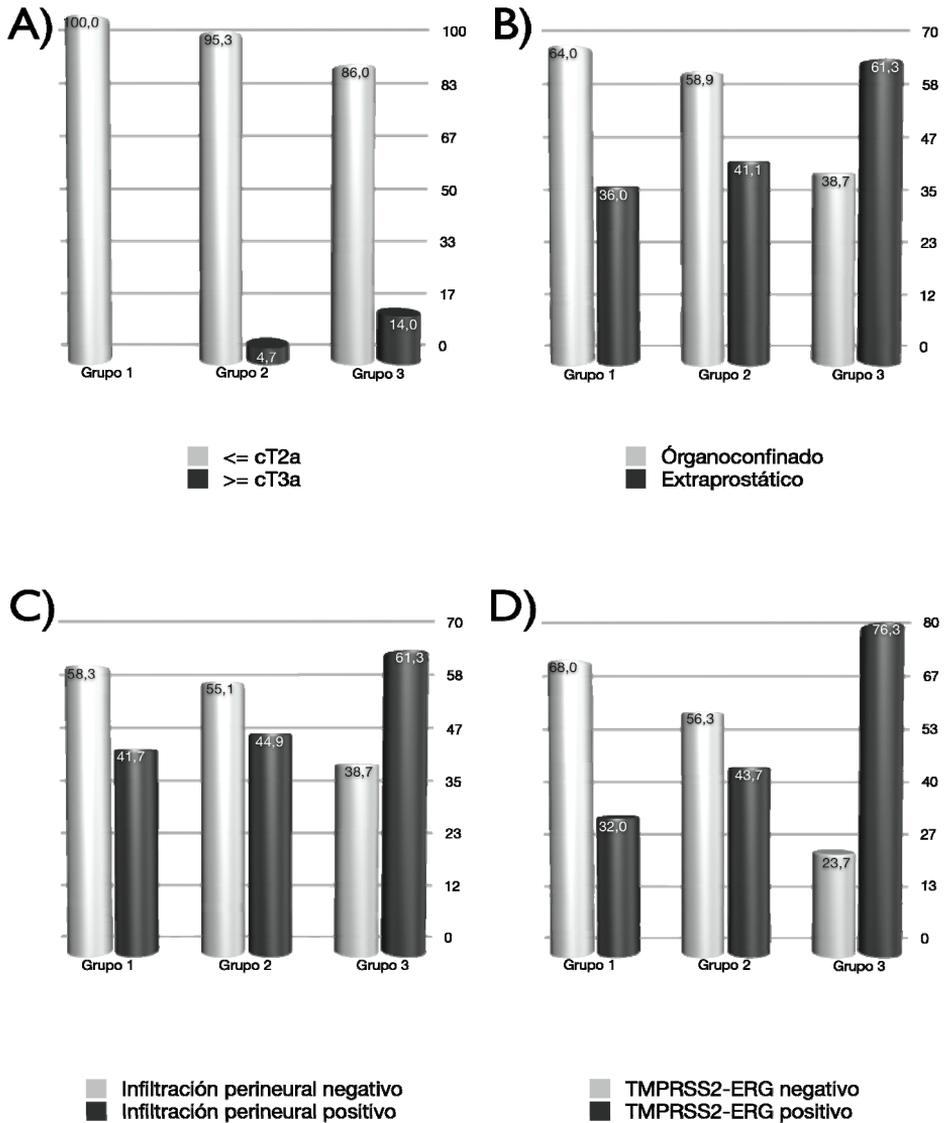
## RESULTADOS

**Tabla 49 (cont.):** relación entre los grupos de expresión y los PCP para la serie global \*

PCP	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	p
<b>Infiltración perineural</b>				
Negativos	14 (58,3%)	103 (55,1%)	36 (38,7%)	<b>0,026</b>
Positivos	10 (41,7%)	84 (44,9%)	57 (61,3%)	
<b><i>TMPRSS2-ERG</i></b>				
Negativos	17 (68%)	107 (56,3%)	22 (23,7%)	<b>&lt;0,001</b>
Positivos	8 (32%)	83 (43,7%)	71 (76,3%)	
<b>Progresión bioquímica</b>				
No progresan	14 (55,6%)	118 (62,1%)	50 (53,8%)	0,386
Progresan	11 (44%)	72 (37,9%)	43 (46,2%)	
<b>Progresión</b>				
No progresan	19 (76%)	150 (78,9%)	66 (71%)	0,333
Progresan	6 (24%)	40 (21,1%)	27 (29%)	

\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número (12) de casos válidos.

En la siguiente figura (46) se pueden apreciar los histogramas de las relaciones estadísticamente significativas entre los patrones de expresión y los PCP.



**Figura 46:** Gráficos de barras correspondientes a la relación entre los 3 grupos de expresión de la serie global con A) el estadio clínico (cT) ( $p=0,006$ ) B) el estadio patológico (pT) ( $p=0,03$ ) C) la presencia de infiltración perineural ( $p=0,026$ ) y D) la presencia de *TMPRSS2-ERG* ( $p<0,001$ ).

### **4.1.8.- Análisis de supervivencia.**

En este apartado se procede al análisis univariante de supervivencia usando el test log-rank (313, 314) de todos los parámetros analizados en este trabajo divididos en tres bloques el primero de ellos comprende los PCP, en segundo lugar parámetros de expresión génica y finalmente los de expresión proteica. La supervivencia se aplicará sobre 3 grupos de pacientes:

- A) serie global que incluye el total de casos,
- B) casos no portadores del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*
- C) casos que presentan el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Los parámetros que resulten estadísticamente significativos en este análisis se introducirán en un análisis de supervivencia multivariante por regresión de Cox (315).

Para ambos análisis se tomarán 2 puntos finales;

- A: el intervalo libre de progresión bioquímica (ILPB).
- B: el intervalo libre de progresión clínica (ILP).

#### **4.1.8.1.- Análisis univariante respecto al Intervalo Libre de Progresión Bioquímica.**

Los resultados del análisis de supervivencia univariante respecto a los PCP, la expresión génica y la expresión proteica se pueden observar en las 50, 51 y 52 respectivamente. En la figura 47 se pueden observar las curvas de Kaplan-Meier de los parámetros estadísticamente significativos para dicho análisis.

**Tabla 50:** resultados del test log-rank respecto al ILPB de los PCP en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG -</i>				<i>TMPRSS2-ERG +</i>				
	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p	
<b>PSA</b>													
≤ 10ng/ml	184	55	57	<b>&lt;0,001</b>	90	29	57	<b>&lt;0,001</b>	94	26	56	<b>&lt;0,001</b>	
10-20 ng/ml	86	43	40		38	19	35		48	24	43		
>20ng/ml	44	30	22		22	15	19		22	15	22		
<b>Estadio de Gleason</b>													
2-6	137	38	65	<b>&lt;0,001</b>	63	18	63	<b>&lt;0,001</b>	74	20	68	<b>&lt;0,001</b>	
7	143	65	38		65	30	44		78	35	30		
8-10	34	25	0		22	15	0		12	10	17		
<b>cT</b>													
≤cT2c	291	111	51	<b>&lt;0,001</b>	136	52	52	<b>&lt;0,001</b>	155	59	49	<b>0,028</b>	
≥cT3a	23	17	15		14	11	0		9	6	33		
<b>pT</b>													
Órganoconfinado	167	48	62	<b>&lt;0,001</b>	82	26	56	<b>&lt;0,001</b>	85	22	73	<b>0,001</b>	
Extraprostatico	147	80	35		68	37	38		79	43	32		
<b>PIN</b>													
Ausente	239	101	48	0,083	111	48	46	0,374	128	53	51	0,124	
Presente	46	13	63		22	7	62		24	6	70		
<b>Infiltración perineural</b>													
Ausente	157	48	54	<b>&lt;0,001</b>	83	24	58	<b>&lt;0,001</b>	74	24	46	<b>0,038</b>	
Presente	153	77	44		64	37	34		89	40	50		
<b><i>TMPRSS2-ERG</i></b>													
Ausente	150	63	47	0,548	-	-	-	-	-	-	-	-	
Presente	164	65	49		-	-	-		-	-	-		
<b>Mecanismo reordenamiento</b>													
Negativo	86	29	56	0,437	-	-	-	-	14	3	79	0,647	
Translocación recíproca	84	37	38		-	-	-		-	74	31		34
Deleción	22	9	36		-	-	-		-	19	8		47

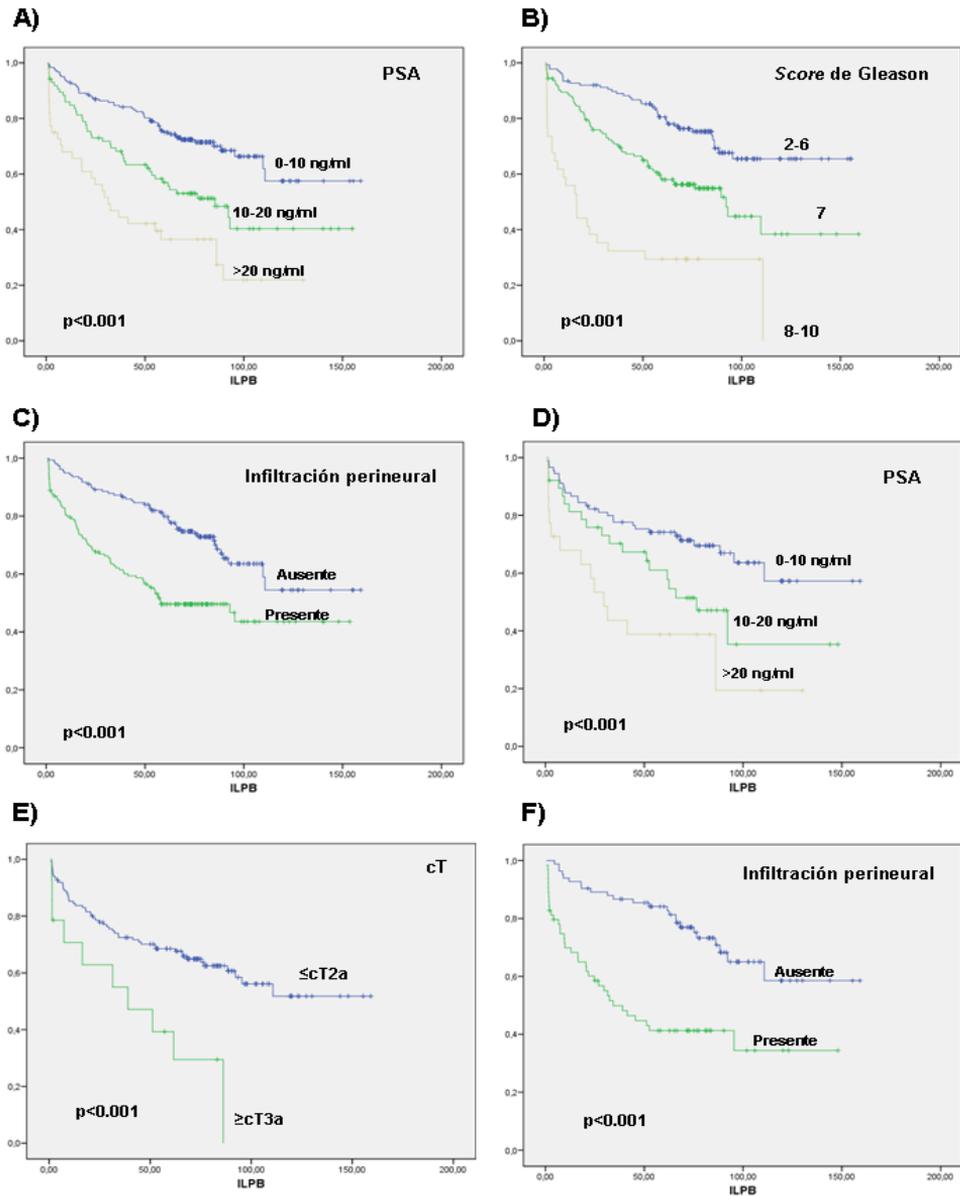
**Tabla 51:** resultados del test log-rank respecto al ILPB de los parámetros de expresión génica en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG</i> -				<i>TMPRSS2-ERG</i> +			
	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b>												
Infraexpresión	154	70	46	0,211	75	38	37	0,126	79	32	56	0,826
Sobreexpresión	154	58	46		70	25	54		84	33	27	
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b>												
Infraexpresión	157	60	55	0,441	75	31	49	0,766	82	29	63	0,432
Sobreexpresión	156	68	41		74	32	44		82	36	34	
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b>												
Infraexpresión	105	44	50	0,573	52	24	45	0,864	53	20	57	0,485
Sobreexpresión	105	37	42		42	18	36		63	19	45	
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b>												
Infraexpresión	101	41	52	0,996	52	24	46	0,654	47	17	60	0,811
Sobreexpresión	101	41	47		24	11	44		80	30	47	
<b><i>ETV1</i> exón 1,3</b>												
Infraexpresión	152	58	44	0,479	67	27	19	0,831	85	31	57	0,476
Sobreexpresión	153	67	48		77	34	52		76	33	27	
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b>												
Infraexpresión	148	63	41	0,490	65	30	21	0,512	83	33	51	0,687
Sobreexpresión	149	59	51		72	29	53		77	30	40	
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b>												
Infraexpresión	129	58	48	0,09	60	33	36	<b>0,014</b>	69	25	60	0,907
Sobreexpresión	127	43	47		55	16	58		72	27	36	
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b>												
Infraexpresión	267	111	47	0,284	118	53	40	0,211	149	58	56	0,747
Sobreexpresión	23	8	46		16	5	67		7	3	0	

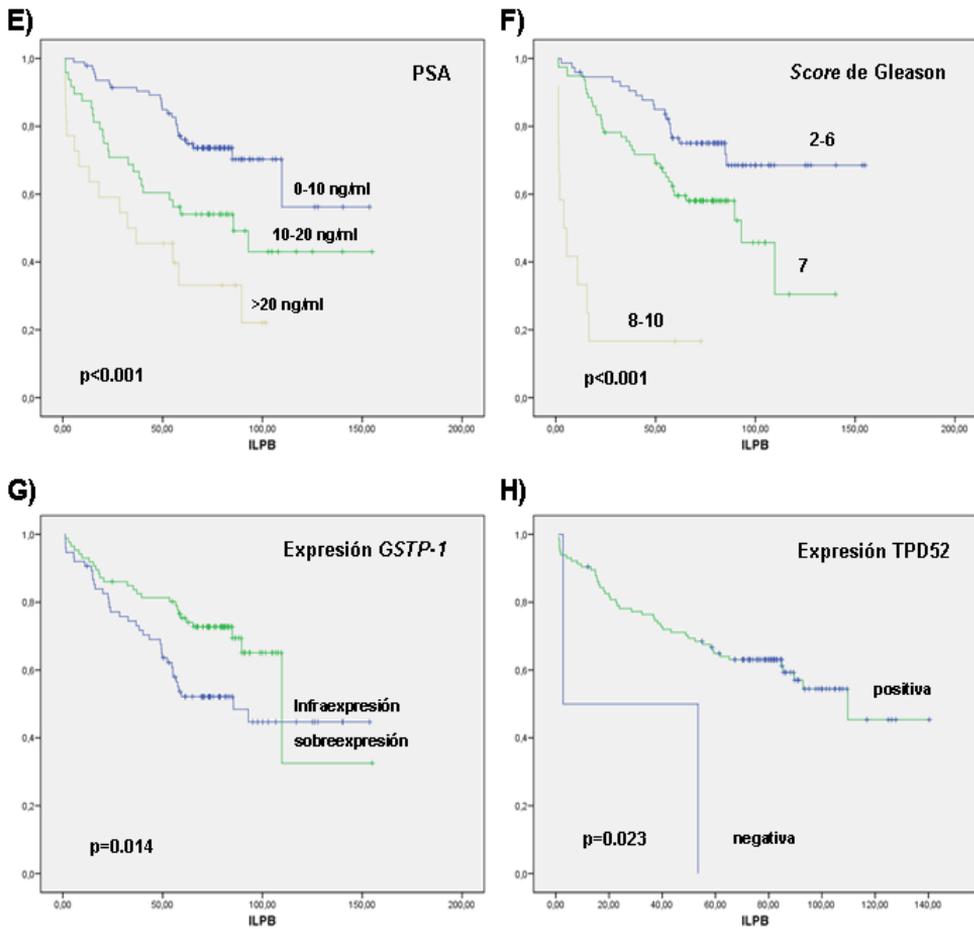


**Tabla 52:** resultados del test log-rango respecto al ILPB de los parámetros de expresión proteica en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG -</i>				<i>TMPRSS2-ERG +</i>			
	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p	n	Eventos	%ILPB	p
<b>PTEN</b>												
Negativo	112	44	42	0,528	53	20	58	0,376	59	24	32	0,899
Positivo	106	49	43		49	26	32		57	23	55	
<b>Ki67</b>												
Negativo	195	82	43	0,321	94	38	44	<b>0,02</b>	101	44	41	0,405
Positivo	57	28	41		28	18	22		29	10	57	
<b>Cav-1 SC</b>												
Negativo	7	5	19	<b>0,025</b>	3	1	67	0,954	4	4	0	<b>0,001</b>
Positivo	208	92	45		98	49	41		110	43	46	
<b>Cav-1 BD</b>												
Negativo	174	77	43	0,791	81	38	41	0,772	93	39	44	0,490
Positivo	47	22	50		24	13	46		23	9	52	
<b>CD-99</b>												
Negativo	19	9	28	0,972	11	3	73	0,160	8	6	0	0,078
Positivo	197	89	45		88	46	37		109	43	59	
<b>TPD52</b>												
Negativo	3	2	0	0,261	1	0	-	-	2	2	0	<b>0,023</b>
Positivo	212	96	43		97	49	40		115	47	45	



**Figura: 47:** Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante respecto al ILPB A) Concentración de PSA en el diagnóstico en la serie global; B) Estadio de Gleason en la serie global; C) Infiltración perineural en la serie global; D) Concentración de PSA en casos negativos para el gen de fusión; E) cT en casos negativos para el gen de fusión; F) Infiltración perineural en casos negativos para el gen de fusión



**Figura: 47 (cont.):** Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante respecto al ILPB A) Concentración de PSA en el diagnóstico en la serie global; B) Estadio de Gleason en la serie global; C) Infiltración perineural en la serie global; D) Concentración de PSA en casos negativos para el gen de fusión; E) cT en casos negativos para el gen de fusión; F) Infiltración perineural en casos negativos para el gen de fusión

**4.1.8.2.- Análisis multivariante respecto al Intervalo Libre de Progresión Bioquímica.**

En la tabla 53 están resumidos los resultados del análisis multivariante por regresión de Cox de los parámetros significativos obtenidos del análisis univariante, al igual que en el test anterior se consideran los datos globales y estratificados en casos según presenten o no *TMPRSS2-ERG*.

**Tabla 53:** resultados del análisis de supervivencia multivariante por regresión de Cox de la serie completa y los casos negativos y positivos para el gen de fusión.

	SERIE GLOBAL		<i>TMPRSS2-ERG</i> -		<i>TMPRSS2-ERG</i> +	
	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p
<b>Concentración inicial PSA</b>	2,89 (1,7-4,92)	<0,001	3,65 (1,67-7,94)	0,001	5,26 (2,39-11,63)	<0,001
<b>Estadio de Gleason</b>	5,7 (3,02-10,87)	<0,001	-		22,7 (7,52-71,42)	<0,001
<b>cT</b>	-		2,28 (1,05-4,93)	0,037	-	
<b>Infiltración perineural</b>	1,91 (1,23-2,95)	0,003	4,05 (2,04-8)	<0,001	-	
<b>Expresión <i>GSTP-1</i></b>	-		-		0,42 (0,22-0,79)	0,007
<b>Expresión <i>TPD52</i></b>	-		-		0,19 (0,04-0,91)	0,038

Los casos de CaP tienen un perfil pronóstico diferente según porten o no *TMPRSS2-ERG*. En la serie global sólo tienen valor pronóstico independiente 3 PCP (el estadio de Gleason, los niveles preoperatorios de PSA y la presencia de infiltración perineural), mientras que los casos que no portan el gen de fusión los predictores son los niveles preoperatorios del PSA, el estadio clínico y la infiltración perineural y los casos portadores del gen de fusión tienen como factor de riesgo independiente el

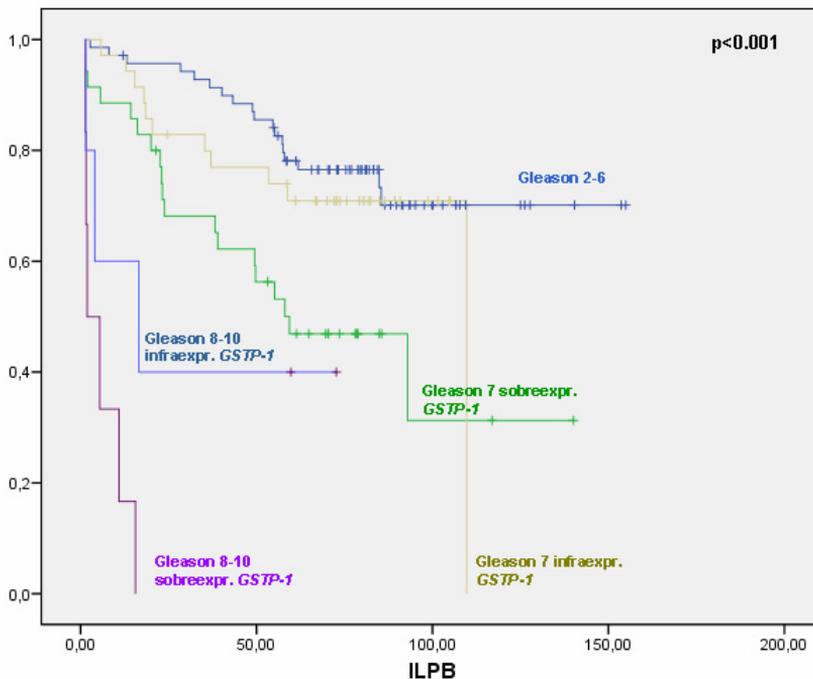
## RESULTADOS

estado de Gleason, la concentración diagnóstica de PSA, la expresión de *GSTP-1* y de TPD52.

A fin de refinar los resultados de este análisis se crea una nueva variable en los casos que portan el gen de fusión. Esta variable comprende el estado de Gleason y la expresión génica de *GSTP-1* y está compuesta por 5 categorías:

- 1) Gleason de 2 a 6 y expresión indistinta de *GSTP-1*
- 2) Gleason de 7 y sobreexpresión de *GSTP-1*,
- 3) Gleason de 7 e infraexpresión de *GSTP-1*
- 4) Gleason de 8 a 10 y sobreexpresión de *GSTP-1*,

5) Gleason de 8 a 10 e infraexpresión de *GSTP-1*. En la figura 49 aparece la gráfica de Kaplan-Meier correspondiente al análisis de supervivencia univariante de esta variable.



**Figura 48:** gráfica de Kaplan-Meier del parámetro que combina el estado de Gleason y la expresión de *GSTP-1*.

Introduciendo este nuevo parámetro en el análisis multivariante se obtiene un nuevo perfil pronóstico. (Tabla 53).

**Tabla 54:** resultados del análisis de supervivencia multivariante por regresión de Cox de los casos positivos para el reordenamiento *TMPRSS2-ERG* introduciendo la nueva variable que comprende el estadio de Gleason y la expresión de *GSTP-1*.

	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> +</b>	
	<b>HR IC 95% (mínimo-máximo)</b>	<b>p</b>
<b>Concentración inicial PSA</b>	5,23 (2,31-11,76)	<0,001
<b>Expresión proteica TPD-52</b>	0,18 (0,04-0,91)	0,035
<b>Estadio de Gleason + expresión <i>GSTP-1</i></b>	15,62 (4,13-58,82)	<0,001

### **4.1.8.3.- Análisis univariante respecto al Intervalo Libre de Progresión clínica,**

Los resultados del análisis de supervivencia univariante (test log-rank) respecto a los PCP, y los parámetros referentes a la expresión génica y la expresión proteica se pueden observar en las tablas 55, 56 y 57 respectivamente. En la figura 49 están representadas las curvas de Kaplan-Meier de los parámetros estadísticamente significativos para el análisis univariante.

La significación se ha establecido para la serie global y los casos que no portan y que portan el gen *TMPRSS2-ERG*.

**Tabla 55:** resultados del test log-rank respecto al ILP de los PCP en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG</i> -				<i>TMPRSS2-ERG</i> +			
	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p
<b>PSA</b>												
≤ 10ng/ml	184	30	74	<b>0,04</b>	90	17	71	0,315	94	13	79,5	<b>0,003</b>
10-20 ng/ml	86	28	53		38	9	61		48	19	45	
>20ng/ml	44	16	40		22	8	59		22	8	28	
<b>Estadio de Gleason</b>												
2-6	137	19	70	<b>&lt;0,001</b>	63	8	76	<b>0,001</b>	74	11	65	<b>0,009</b>
7	143	42	57		65	17	64		78	25	49	
8-10	34	13	52		22	9	54		12	4	43	
<b>cT</b>												
≤cT2c	291	67	60	0,356	136	30	66	0,479	155	37	54	0,600
≥cT3a	23	7	65		14	4	69		9	3	62	
<b>pT</b>												
Órganoconfinado	167	27	73	<b>0,002</b>	82	13	73	<b>0,017</b>	85	14	76	0,065
Extraprostatico	147	47	49		68	21	58		79	26	45	
<b>PIN</b>												
Ausente	239	55	62	0,732	111	25	67	0,861	128	30	59	0,457
Presente	46	9	78		22	5	75		24	4	82	
<b>Infiltración perineural</b>												
Ausente	157	26	75	<b>0,001</b>	83	11	78	<b>&gt;0,001</b>	74	15	75	0,164
Presente	133	46	53		64	22	50		89	24	55	
<b><i>TMPRSS2-ERG</i></b>												
Ausente	150	34	67	0,626	-	-	-	-	-	-	-	-
Presente	164	40	57		-	-	-		-	-	-	
<b>Mecanismo reordenamiento</b>												
Negativo	86	17	63	0,583	-	-	-	-	14	2	81	0,708
Translocación recíproca	84	22	70						74	17	63	
Deleción	22	5	74						19	5	71	

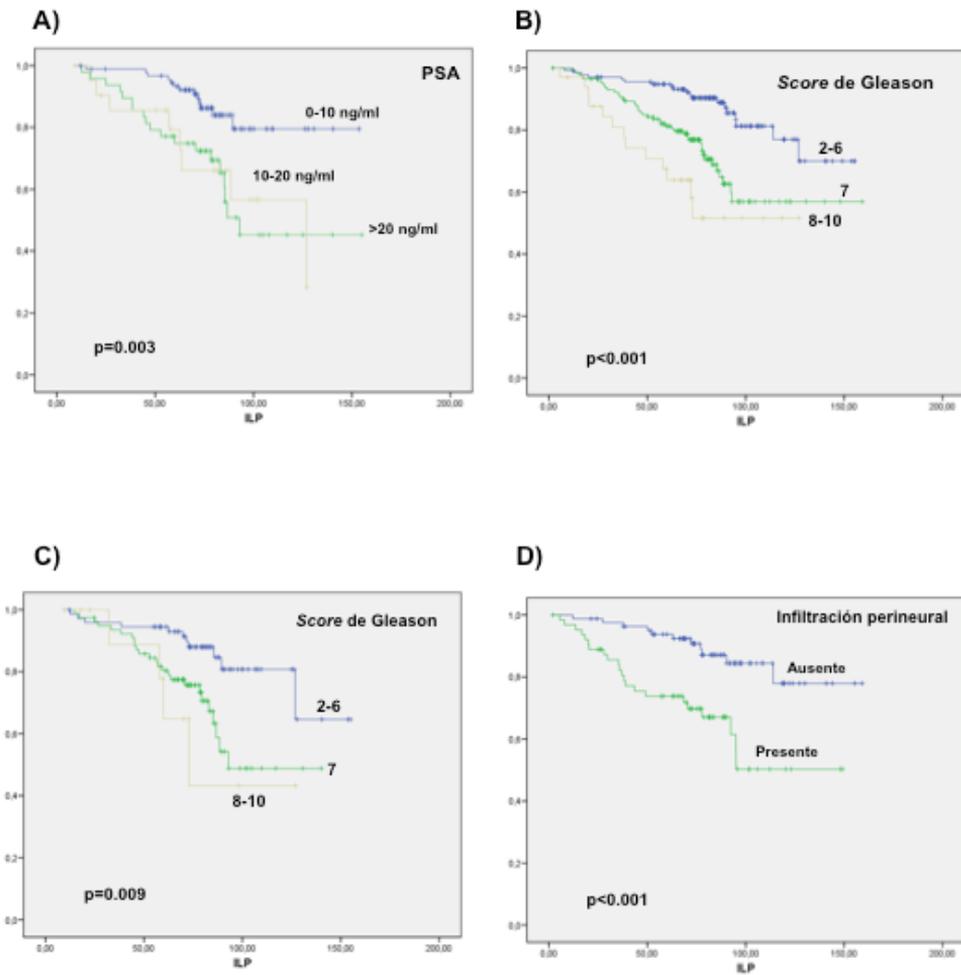
**Tabla 56:** resultados del test log-rango respecto al ILP de los parámetros de expresión génica en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG -</i>				<i>TMPRSS2-ERG +</i>			
	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b>												
Infraexpresión	154	35	64	0,532	75	18	60	0,964	79	17	69	0,516
Sobreexpresión	154	38	58		70	15	76		84	23	41	
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b>												
Infraexpresión	157	32	64	0,328	75	15	65	0,348	82	17	61	0,755
Sobreexpresión	156	42	59		74	19	69		82	23	49	
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b>												
Infraexpresión	105	22	66	0,525	52	12	67	0,412	53	10	64	0,886
Sobreexpresión	105	25	56		42	12	62		63	13	50	
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b>												
Infraexpresión	101	23	58	0,617	54	13	64	0,720	47	10	50	0,702
Sobreexpresión	101	26	63		21	6	68		80	20	60	
<b><i>ETV1</i> exón 1,3</b>												
Infraexpresión	152	33	67	0,769	67	13	75	0,707	85	20	61	0,825
Sobreexpresión	153	39	60		77	20	66		76	19	46	
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b>												
Infraexpresión	148	35	62	0,939	65	12	64	0,201	83	23	58	0,276
Sobreexpresión	149	37	58		72	20	61		77	17	52	
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b>												
Infraexpresión	129	31	66	0,749	60	15	68	0,629	69	16	62	0,992
Sobreexpresión	127	27	61		55	11	69		72	16	65	
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b>												
Infraexpresión	267	66	62	0,055	118	28	64	0,246	149	38	61	-
Sobreexpresión	23	2	85		16	2	80		7	0	-	

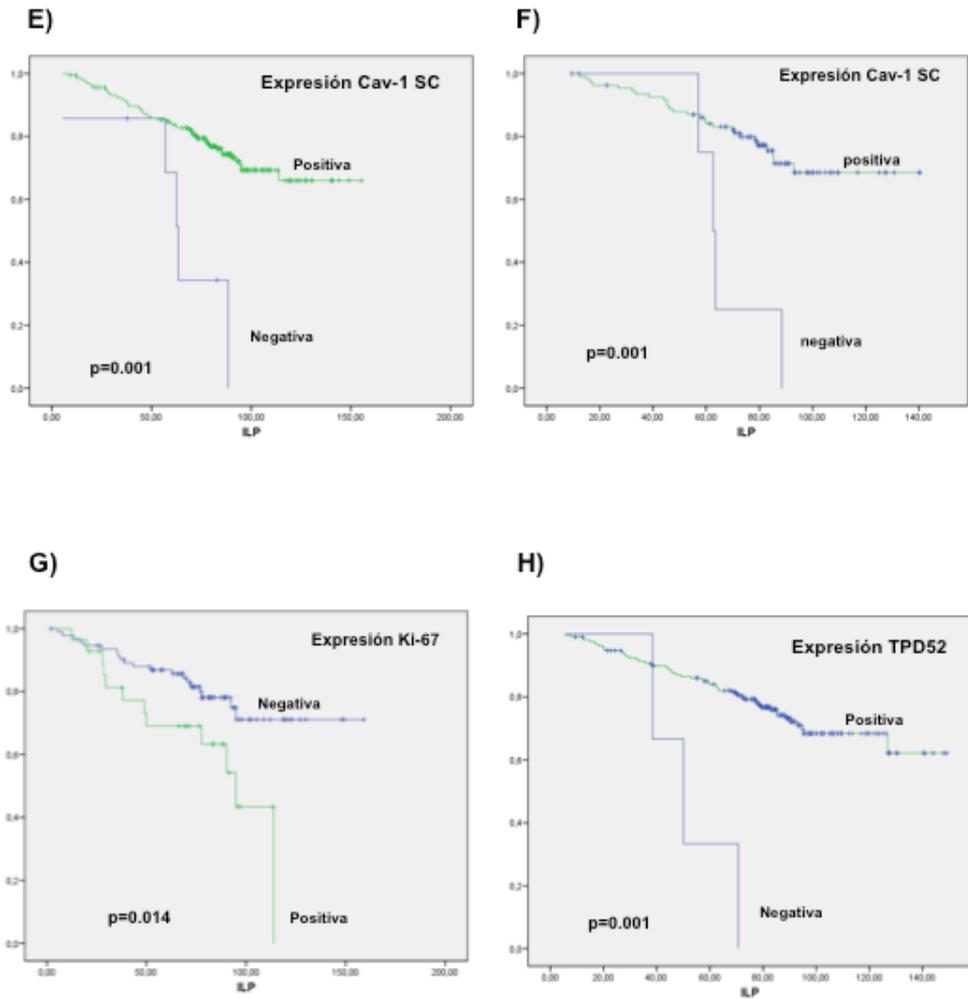


**Tabla 57:** resultados del test log-rango respecto al ILP de los parámetros de expresión proteica en los 3 grupos de casos, la serie global, los que no portan *TMPRSS2-ERG* y los casos con el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

Parámetros	Serie global				<i>TMPRSS2-ERG -</i>				<i>TMPRSS2-ERG +</i>			
	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p	n	Eventos	%ILP	p
<b>PTEN</b>												
Negativo	112	29	44	0,283	53	15	49	0,302	59	14	40	0,711
Positivo	106	24	70		49	12	70		57	12	70	
<b>Ki67</b>												
Negativo	195	47	59	0,336	94	20	71	<b>0,014</b>	101	27	46	0,281
Positivo	57	17	28		28	12	0		29	5	73	
<b>Cav-1 SC</b>												
Negativo	7	5	0	<b>0,001</b>	3	1	67	0,368	4	4	0	<b>0,001</b>
Positivo	208	53	66		98	26	65		110	27	68	
<b>Cav-1 BD</b>												
Negativo	174	48	62	0,232	81	21	70	0,609	93	27	50	0,264
Positivo	47	11	63		24	6	60		23	5	67	
<b>CD-99</b>												
Negativo	19	5	67	0,863	11	2	81	0,625	8	3	48	0,805
Positivo	197	53	61		88	23	69		109	30	53	
<b>TPD52</b>												
Negativo	3	3	0	<b>&lt;0,001</b>	1	1	0	0,054	2	2	0	<b>0,003</b>
Positivo	212	55	62		97	24	70		115	31	53	



**Figura: 49:** Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante respecto al ILP A) Concentración inicial de PSA en casos *TMPRSS2-ERG* positivos. B) Estadio de Gleason en la serie global C) Grado de Gleason en casos *TMPRSS2-ERG* positivos. D) Infiltración perineural en casos *TMPRSS2-ERG* negativos.



**Figura: 49 (cont.):** Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante respecto al ILP E) Expresión proteica de Cav-1 medida con el ac de SC en la serie global. F) Expresión de Cav-1 medida con el ac de SC en casos *TMPRSS2-ERG* positivos. G) Expresión proteica de Ki67 en casos *TMPRSS2-ERG* negativos. H) Expresión proteica de TPD52 en la serie global.

**4.1.8.4.- Análisis multivariante respecto al intervalo libre de progresión.**

En la tabla 58 están resumidos los resultados del análisis multivariante por regresión de Cox de la serie completa y los casos que no portan y que portan el reordenamiento *TMPRSS2-ERG*.

**Tabla 58:** resultados del análisis de supervivencia libre de progresión multivariante por regresión de Cox de la serie completa y los casos negativos y positivos para el gen de fusión.

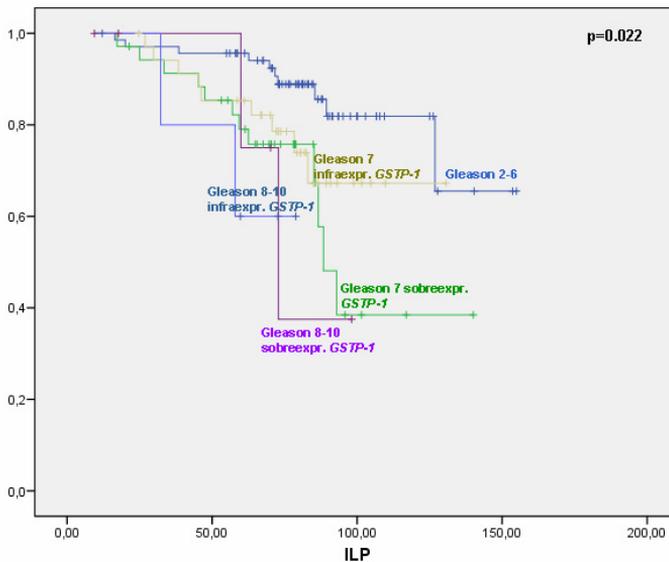
	SERIE GLOBAL		<i>TMPRSS2-ERG</i> -		<i>TMPRSS2-ERG</i> +	
	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p	HR IC 95% (mínimo-máximo)	p
<b>Concentración inicial PSA</b>	-		-		0,57 (0,11-2,97)	0,021
<b>Estadio de Gleason</b>	8,13 (3,51-18,86)	<0,001	-		8,47 (2,18-32,25)	0,002
<b>Infiltración perineural</b>	-		2,83 (1,33-6,02)	0,007	-	
<b>Expresión IHQ Ki-67</b>	-		2,14 (1,02-4,48)	0,044	-	
<b>Expresión TPD52</b>	0,15 (0,04-0,51)	0,002	-		-	

## RESULTADOS

En el análisis respecto al ILP se da un comportamiento análogo al del análisis multivariante respecto al ILPB en cuanto al diferente panel de factores pronósticos de progresión según el estado del gen de fusión, pese a que no coinciden con los mismos factores relacionados con la progresión bioquímica

Los casos de CaP también presentan un perfil pronóstico distinto para el ILP según el estatus del reordenamiento *TMPRSS2-ERG*. Mientras que para la serie global son factores de riesgo independientes: el estadios de Gleason, la expresión proteica de Cav-1 medida con el ac de SC y la expresión de TPD52, para los casos que no portan el gen de fusión sólo son factores de riesgo la presencia de infiltración perineural y la expresión proteica de Ki67. Los casos portadores del reordenamiento génico tienen como predictores de progresión clínica el estadios de Gleason, la concentración sérica de PSA en el diagnóstico y la expresión proteica de Cav-1 medida con el ac de SC.

Análogamente a lo que sucedía en el ILPB, el factor que combina el score de Gleason y la expresión de *GSTP-1* es significativo en el análisis univariante de Kaplan-Meier en el grupo de los CaP que expresan *TMPRSS2-ERG* (figura 50), no obstante esta significación no se mantiene en el análisis multivariante.



**Figura 50:** gráfica de Kaplan-Meier del ILP del parámetro que combina el estadios de Gleason y la expresión de *GSTP-1*.

#### **4.1.8.- Análisis diferencial de Progresión.**

A continuación se exponen los resultados del análisis diferencial tanto con respecto a los PCP como a la expresión génica y proteica considerando sólo los casos que progresan clínica, localmente o metástasis respecto a los casos con progresión bioquímica. Estos casos son un total de 128 con un seguimiento mediano de 83,58 (9,43-159,8) meses.

En la siguiente tabla aparecen la descripción de los principales PCP que definen esta subserie de 128 casos con progresión bioquímica (tabla 59).

## RESULTADOS

**Tabla 59:** PCP característicos de la subserie de casos que progresan bioquímicamente

<b>Parámetro</b>	<b>n=128(%)</b>
<b>Edad</b> mediana (rango)	66,5 (53-84) años
<b>PSA inicial</b> <10ng/ml 10-20ng/ml >20ng/ml	55 (43) 43 (33,6) 30 (23,4)
<b>Gleason-sp*</b> 2-6 7 >7	38 (29,7) 65 (50,8) 25 (19,5)
<b>cT</b> ≤ cT2c > cT3a	111 (86,7) 17 (13,3)
<b>pT</b> Órganoconfinado Extraprostático	48 (37,5) 80 (62,5)
<b>Ganglios afectados (N)</b> No Si	110 (85,9) 10 (7,8)
<b>PIN</b> Ausente Presente	101 (78,9) 13 (10,2)
<b>Infiltración perineural</b> Ausente Presente	48 (37,5) 77 (60,2)
<b>Progresión clínica</b> No progresan Progresan	55 (43) 73 (27)

\*Gleason-sp: Gleason de la pieza quirúrgica.

De los 128 CaP que presentan progresión bioquímica, 73 (57 %) también progresaron clínica, localmente y/o a distancia. En estas muestras se analizó la correlación entre la progresión y las variantes clínico-patológicas citadas en la anterior tabla. (Tabla 60)

**Tabla 60:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y el gen *TMPRSS2-ERG\**.

Parámetros	Sólo Progresión Bioquímica	Progresión clínica / local / a distancia.	p
<b>PSA inicial</b>			
<10 ng/ml	25 (45,5)	30 (41,1)	0,641
10-20 ng/ml	16 (29,1)	27 (37)	
>20 ng/ml	14 (25,5)	16 (21,9)	
<b>Score de Gleason</b>			
2-6	19 (34,5)	19 (26)	0,369
7	24 (43,6)	41 (56,2)	
8-10	12 (21,8)	13 (17,8)	
<b>cT (estadio clínico)</b>			
≤cT2c	45 (81,8)	66 (90,4)	0,124
≥cT3a	10 (18,2)	7 (9,6)	
<b>pT (estadio patológico)</b>			
Órganoconfinado	22 (40)	26 (35,6)	0,373
Extraprostático	33 (60)	47 (64,4)	
<b>PIN</b>			
Ausencia	46 (92)	55 (85,9)	0,240
Presencia	4 (8)	9 (14,1)	

## RESULTADOS

**Tabla 60 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y el gen *TMPRSS2-ERG*\*.

<b>Parámetros</b>	<b>Sólo Progresión Bioquímica</b>	<b>Progresión clínica / local / a distancia.</b>	<b>p</b>
<b>Infiltración perineural</b>			
Ausente	23 (43,6)	25 (35,2)	0,256
Presente	31 (57,4)	46 (64,8)	
<b><i>TMPRSS2-ERG</i></b>			
Negativo	30 (54,5)	33 (45,2)	0,193
Positivo	25 (45,5)	40 (54,8)	
<b>Perfil expresión</b>			
Grupo 1	5 (9,3)	6 (8,3)	0,654
Grupo 2	33 (61,1)	39 (54,2)	
Grupo 3	16 (29,6)	27 (37,5)	

\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número (12) de casos válidos.

No se observa relación entre la presencia de progresión y ninguno de los PCP.

Las relaciones entre la expresión génica y la presencia de progresión aparecen en la siguiente tabla (tabla 61).

**Tabla 61:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de los genes estudiados y la presencia de progresión.

Parámetros	Sólo Progresión Bioquímica	Progresión clínica / local / a distancia.	p
<b><i>TMPRSS2</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	35 (63,6) 20 (36,4)	35 (47,9) 38 (52,1)	0,056
<b><i>TMPRSS2</i> exón 7,8</b> < mediana ≥ mediana	28 (50,9) 27 (49,1)	32 (43,8) 41 (56,2)	0,269
<b><i>ERG</i> exón 1,2</b> < mediana ≥ mediana	22 (62,9) 13 (37,1)	22 (47,8) 24 (52,2)	0,131
<b><i>ERG</i> exón 9,10</b> < mediana ≥ mediana	18 (54,5) 15 (45,5)	23 (46,9) 26 (53,1)	0,326
<b><i>ETV1</i> exón 1-3</b> < mediana ≥ mediana	25 (46,3) 29 (53,7)	33 (46,5) 38 (53,5)	0,564
<b><i>ETV1</i> exón 5,6</b> < mediana ≥ mediana	29 (56,9) 22 (43,1)	34 (47,9) 37 (52,1)	0,213
<b><i>ETV4</i> exón 2,3</b> < mediana ≥ mediana	27 (61,4) 17 (38,6)	31 (54,4) 26 (45,6)	0,309
<b><i>ETV4</i> exón 10,11</b> < mediana ≥ mediana	46 (88,5) 6 (11,5)	65 (97) 2 (3)	0,07
<b><i>PCA3</i></b> < mediana ≥ mediana	26 (49,1) 27 (50,9)	31 (45,6) 37 (54,4)	0,422
<b><i>HEPSIN</i></b> < mediana ≥ mediana	24 (44,4) 30 (55,6)	29 (41,4) 41 (58,6)	0,439

## RESULTADOS

**Tabla 61 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de los genes estudiados y la presencia de progresión.

Parámetros	Sólo Progresión Bioquímica	Progresión clínica / local / a distancia.	p
<b><i>PAR-2</i></b> < mediana ≥ mediana	24 (50) 24 (50)	34 (52,3) 31 (47,7)	0,479
<b><i>GSTP-1</i></b> < mediana ≥ mediana	33 (64,7) 18 (35,3)	40 (56,3) 31 (43,7)	0,229
<b><i>AMACR</i></b> < mediana ≥ mediana	23 (42,6) 31 (57,4)	31 (43,7) 40 (56,3)	0,525
<b><i>Cav-1</i></b> < mediana ≥ mediana	26 (47,3) 29 (52,7)	44 (61,1) 28 (38,9)	0,085

Aunque no alcanza la significación estadística ninguno de los genes estudiados, sí que se aprecia una tendencia directa entre la expresión de *TMPRSS2* (exones 2 y 3) y la presencia de progresión ( $p=0,056$ ), así como una tendencia a la correlación inversa entre la expresión de *Cav-1* y la presencia de progresión local o a distancia.

La relación entre la expresión proteica y la presencia de progresión se reflejan en la tabla 62.

**Tabla 62:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre la expresión de las proteínas estudiadas y la presencia de Progresión.

Parámetros	Sólo Progresión Bioquímica	Progresión clínica / local / a distancia.	p
<b>PTEN</b> Negativo Positivo	16 (39) 25 (61)	28 (53,8) 24 (46,2)	0,113
<b>Ki67</b> Negativo Positivo	35 (74,5) 12 (25,5)	47 (74,6) 16 (25,4)	0,579
<b>Cav-1 SC</b> Negativo Positivo	0 (0) 40 (100)	5 (8,8) 52 (91,2)	0,065
<b>Cav-1 BD</b> Negativo Positivo	30 (73,2) 11 (26,8)	47 (81) 11 (19)	0,247
<b>CD-99</b> Negativo Positivo	4 (9,8) 37 (90,2)	5 (8,8) 52 (91,2)	0,568
<b>TPD52</b> Negativo Positivo	0 (0) 41 (100)	2 (3,5) 55 (96,5)	0,336

Tampoco se alcanza significación entre la progresión local o a distancia con la expresión de los marcadores proteicos por IHQ. No obstante se observa una tendencia a la correlación entre la expresión de Cav-1 medida por el ac de SC y la progresión (p=0,065).

### **4.2- SERIE PROSPECTIVA.**

El objetivo principal de esta parte del trabajo es el uso de la presencia del gen de fusión como marcador para la detección de CTC en la monitorización de la EMR en pacientes en remisión post-tratamiento mediante prostatectomía radical. Para ello partimos de una muestra independiente y prospectiva de pacientes tratados mediante prostatectomía radical Marzo de 2007 hasta Noviembre de 2008. Sobre las piezas de prostatectomía realizamos un estudio de la presencia de *TMPRSS2-ERG* tanto por FISH como por RT-PCR, para identificar aquellos casos portadores del gen de fusión. Paralelamente se tomaron diversas muestras de sangre periférica, antes de la intervención quirúrgica y durante el seguimiento.

#### **4.2.1- Estadística descriptiva.**

En la tabla 63 se detallan los PCP analizados, así como las progresiones bioquímicas y clínicas de los 152 pacientes que componen la rama prospectiva de esta tesis. Esta serie tiene un seguimiento mediano de 20,86 meses (1,23-43,10).

**Tabla 63:** PCP característicos de la serie prospectiva

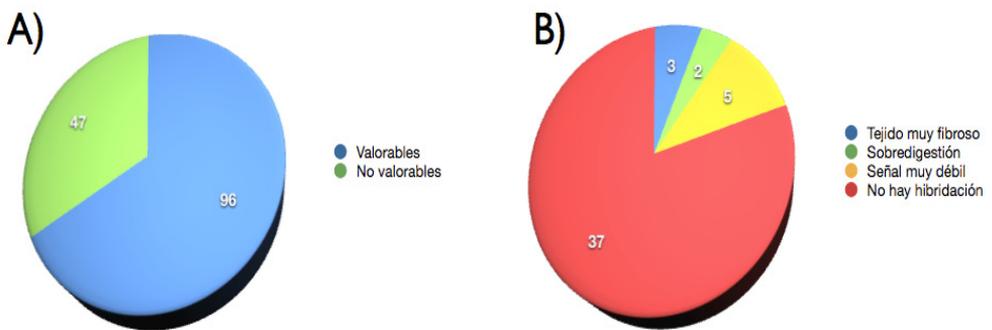
<b>Parámetro</b>	<b>Serie global n (%)</b>
<b>Edad;</b> mediana (rango)	62 años (46-72)
<b>PSA inicial</b> <10ng/ml 10-20ng/ml >20ng/ml	114 (75) 22 (14,5) 16 (10,5)
<b>Gleason-sp</b> 6 7 >7	68, (44,7) 69 (45.4) 15 (9,9)
<b>cT</b> ≤ cT2 > cT2	142 (93,4) 4 (2,6)
<b>pT</b> ≤pT2b ≥pT3a	112 (73,7) 39 (25,7)
<b>Ganglios afectados (N)*</b> No Si	29 (19,1) 3 (2)
<b>PIN</b> Ausente Presente	130 (85,5) 22 (14,5)
<b>Infiltración perineural</b> Negativo Positivo	50 (32,9) 61 (40,1)
<b>Progresión bioquímica</b> No progresa Progresa	130 (85,5) 22 (14,5)
<b>Progresión clínica</b> No progresa Progresa	147 (96,7) 4 (2,6)

\* En el resto de los casos no está disponible el estadio N

#### 4.2.2- Estudio de *TMPRSS2-ERG* por Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) y RT-PCR.

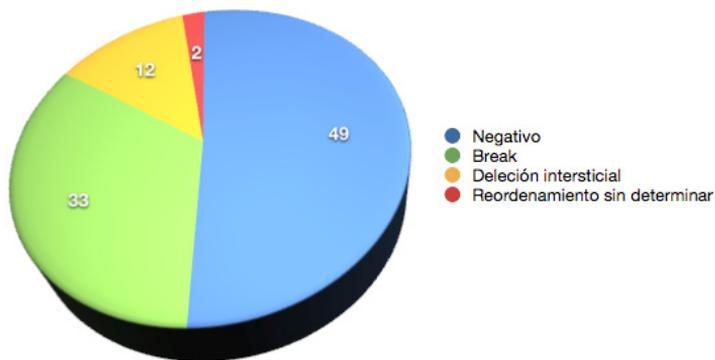
De modo análogo a la serie retrospectiva, se procedió al análisis de la presencia del gen *TMPRSS2-ERG* mediante RT-PCR y FISH, habiéndose detectado un total de 62 (40,8 %) casos positivos para la presencia del gen de fusión con RT-PCR.

Respecto a los resultados obtenidos por FISH, de los 143 casos analizados mediante este procedimiento, 47 no pudieron ser valorados por los motivos especificados en la figura 51. Así, de entre los casos valorables, 47 (49%) eran portadores del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. De éstos, un 34,4% como consecuencia de un patrón de *Break*, un 12,5% debido a una delección intersticial y el 2,1% restante a un reordenamiento sin determinar.



**Figura 51:** esquema de los casos valorables y no valorables. A) Casos valorables y no valorables B) Motivos por los que no se han podido valorar los casos.

En la figura 52 se esquematizan los resultados obtenidos por esta técnica desglosando los casos que presentan el reordenamiento *TMPRSS2-ERG* según el mecanismo por el que se fusionan los genes.



**Figura 52:** diagrama de los resultados del análisis por FISH en la serie prospectiva según el mecanismo de reordenamiento.

En la tabla de contingencia 63 se pueden apreciar los resultados de la comparación de ambas técnicas. RT-PCR tiene una sensibilidad del 81 %, una especificidad del 87 % un Valor Predictivo Positivo (VPP) del 86 % y un Valor Predictivo Negativo (VPN) del 82 % con respecto a la técnica de FISH.

**Tabla 63:** tabla de contingencia relacionando los resultados de la detección de *TPRSS2-ERG* por RT-PCR y por FISH.

		FISH		p
		Negativo	Positivo	
RT-PCR	Negativo	42 (85,7%)	11 (23,9%)	< 0,001
	Positivo	7 (14,3%)	35 (76,1%)	

Al igual que en la rama retrospectiva de este trabajo podemos asumir que los resultados obtenidos con ambas técnicas son comparables con lo que se estudia la relación entre los casos que portan *TMPRSS2-ERG* determinado por RT-PCR y/o por FISH.

### **4.2.5.- Caracterización de *TMPRSS2-ERG* en Células Tumorales Circulantes (CTC).**

Para el análisis de la presencia de CTC en SP, se normaliza la expresión de *TMPRSS2-ERG* con la del gen *ABL*. Este último gen presenta una expresión constitutiva actuando como *housekeeping*. De modo que los resultados se presentan como el ratio de la expresión del gen de fusión y la expresión de *ABL* multiplicada por 100.

De los 152 pacientes sometidos a PTR se pudo obtener una muestra de SP previa a la cirugía en 133 casos (87,5%), el resto de las tomas hasta las 377 analizadas corresponden a tomas sucesivas de estos casos. En todas ellas se cuantificó el transcrito del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, de modo que 33 (24,8%) mostraron una mediana de expresión de 3,26 copias del gen de fusión con un rango entre 0,87 y 13,19. De entre estas muestras, 20 (60,6%) corresponden a pacientes cuya pieza quirúrgica resultó negativa para el gen de fusión, mientras que las 13 restantes (39,4%) sí que expresaban *TMPRSS2-ERG* en la muestra de tejido. De estos pacientes, se analizaron muestras de SP obtenidas en las correspondientes revisiones periódicas a las que se someten estos pacientes. En la tabla 64 se recogen el número de pacientes distribuidos en función de número de tomas de SP que se ha podido recoger, haciendo un total de 142 tomas.

**Tabla 64:** Frecuencia de muestras de SP obtenidas de cada uno de los pacientes que expresó el gen de fusión en la primera toma de SP previa a la cirugía (Toma 1).

Número de pacientes	Número de tomas
3	1
2	2
4	3
6	4
11	5
5	6
2	7

**4.2.5.1.- Asociación entre la presencia de Células Tumorales Circulantes (CTC) en la toma pre-prostatectomía con los Parámetros Clínico Patológicos (PCP).**

La asociación entre la presencia de CTCs en la toma inicial con los PCP queda reflejada en la tabla 65.

## RESULTADOS

**Tabla 65:** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y la presencia de CTC en la toma pre-prostatectomía.\*

<b>Parámetros</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> negativo</b>	<b><i>TMPRSS2-ERG</i> positivo</b>	<b>p</b>
<b>PSA inicial</b>			
<10 ng/ml	79 (76%)	27 (81,8%)	<i>0,079</i>
10-20 ng/ml	12 (11,5%)	6 (18,2%)	
>20 ng/ml	13 (12,5%)	0 (0%)	
<b>Score de Gleason</b>			
2-6	68 (65,4%)	24 (72,7%)	<i>0,725</i>
7	29 (27,9%)	7 (21,2%)	
8-10	7 (6,7%)	2 (6,1%)	
<b>cT (estadio clínico)</b>			
≤cT2c	97 (98%)	32 (100%)	<i>0,570</i>
≥cT3a	2 (2%)	0 (0%)	
<b>pT (estadio patológico)</b>			
Órganoconfinado	76 (73,8%)	29 (87,9%)	<i>0,07</i>
Extraprostático	27 (26,2%)	4 (12,1%)	
<b>PIN</b>			
Ausencia	85 (82,5%)	31 (93,9%)	<i>0,086</i>
Presencia	18 (17,5%)	2 (6,1%)	

**Tabla 70 (cont.):** Resultados del test de Chi cuadrado en la correlación entre los parámetros clínico-patológicos y la presencia de CTC en la toma pre-prostatectomía.\*

Parámetros	<i>TMPRSS2-ERG</i> negativo	<i>TMPRSS2-ERG</i> positivo	p
<b>Infiltración perineural</b>			
Ausente	61 (58,7%)	23 (69,7%)	0,177
Presente	43 (41,3)	10 (30,3)	
<b>Progresión bioquímica</b>			
No progresan	83 (79,8%)	29 (87,9%)	0,219
Progresan	21 (20,2%)	4 (12,1%)	
<b>Progresión</b>			
No progresan	96 (92,3%)	31 (93,9%)	0,551
Progresan	8 (7,7%)	2 (6,1%)	

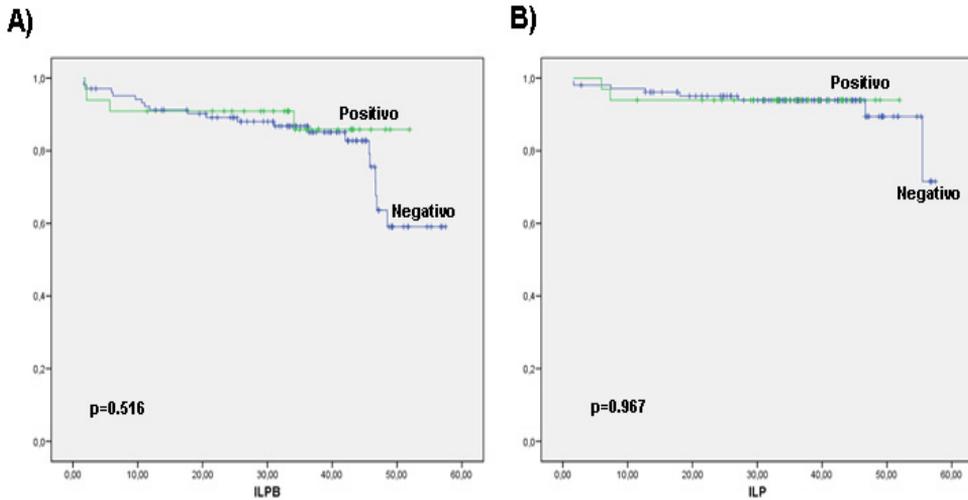
\*La afectación ganglionar (N) se eliminó del análisis debido al pequeño número de casos válidos.

Aunque no se objetiva ninguna relación estadísticamente significativa entre los PCP y la presencia de CTC en la toma preprostatectomía, sí que se han observado tendencias: existen relaciones inversas casi significativas entre la presencia de CTC y la concentración de PSA ( $p=0,079$ ), pT ( $p=0,07$ ) y la presencia de la lesión precursora PIN ( $p=0,086$ ).

Cuando analizamos el impacto de la presencia de CTC con el ILPB e ILP observamos que no existen diferencias en cuanto a supervivencia entre los casos

## RESULTADOS

con niveles detectables del producto del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y los no portadores (figura 53).



**Figura 53:** relación de la presencia de CTC en la primera toma de SP con la supervivencia A) ILPB B) ILP en meses.

Con el fin de comprobar si existe alguna relación entre los niveles de detección de CTC con el PSA en aquellos pacientes con niveles detectables de CTC en la toma previa a la cirugía, representamos la presencia del transcrito del gen de fusión y de una concentración apreciable de PSA en cada una de las tomas en la figura 54 en el seguimiento de los 33 pacientes estudiados.

PACIENTE	TEJIDOS PR	TOMA 1	TOMA 2	TOMA 3	TOMA 4	TOMA 5	TOMA 6	TOMA 7
P1	■ ▲	■ ▲	□ ▲	□ ▲	□ △	□ ▲	□ ▲	
P2	□ ▲	■ △	□ △	□ △	■ △	■ △		
P3	□ ▲	■ ▲	□ △	□ ▲	□ ▲	□ ▲		
P4	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	■ △		
P5	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △				
P6	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ ▲			
P7	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	■ △	■ △	
P8	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	■ △			
P9	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	□ △		
P10	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	■ △	□ △	
P11	□ ▲	■ △	□ △	□ △				
P12	■ ▲	■ ▲	■ △	□ △	■ △	■ △	□ △	
P13	■ ▲	■ ▲	■ △	■ △				
P14	□ ▲	■ △						
P15	□ ▲	■ ▲	□ △	ND	■ △			
P16	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	■ △	□ △	□ △	
P17	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	□ △	□ △	
P18	■ ▲	■ ▲						
P19	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	□ △	□ △	
P20	□ ▲	■ △	□ △					
P21	□ ▲	■ ▲	□ △	■ △				
P22	■ ▲	■ △	□ △	□ △	□ △			
P23	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △			
P24	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	□ △	□ △	□ △
P25	■ ▲	■ ▲						
P26	□ ▲	■ △	■ △	□ △				
P27	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	□ △		
P28	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △				
P29	■ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △	■ △		
P30	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △	□ △			
P31	□ ▲	■ △	□ △	□ △				
P32	□ ▲	■ ▲						
P33	□ ▲	■ ▲	□ △	□ △				

TMPRSS2-ERG +    ■  
 TMPRSS2-ERG -    □  
 PSA +            ▲  
 PSA -            △

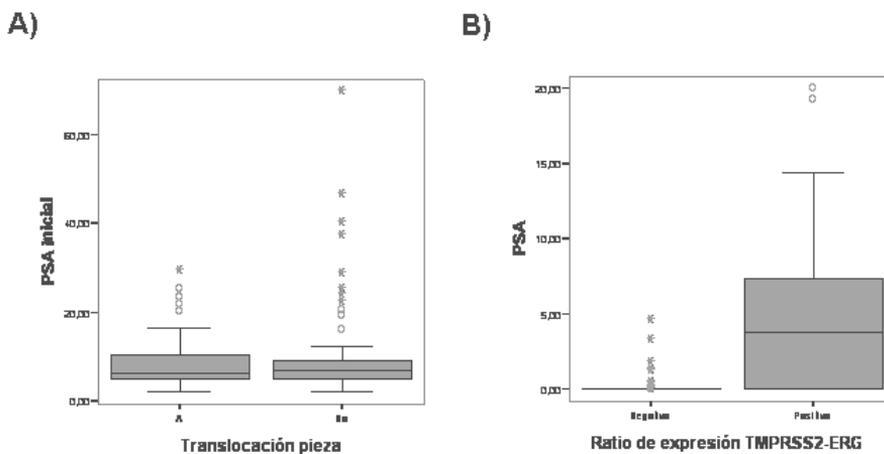
**Figura 54:** esquema de los resultados obtenidos en el análisis de las CTC por qRT-PCR para cada toma se tienen en cuenta los niveles séricos de PSA y el número de copias del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.

## RESULTADOS

Entre estos resultados cabe destacar que 3 (9,1%) de los pacientes positivizan los niveles séricos de PSA en algún momento del seguimiento y 1 paciente (3%) los negativiza. Por otro lado, 11 pacientes (33%) presentan CTC en el seguimiento y 5 (15,1%) han presentado este tipo de células en algún momento, pero las han negativizado durante el seguimiento. Dos de los pacientes de la serie están en progresión bioquímica y otro en progresión local.

Tal como se puede comprobar en la figura anterior no existe correlación entre los niveles de expresión de *TMPRSS2-ERG* y los valores séricos de PSA en cada una de las tomas ( $p=0,799$ ). Tampoco se aprecia asociación entre el grado de expresión del gen de fusión con las tomas ( $p=0,330$ )

En la figura 55 se aprecian los diagramas de cajas correspondientes a las correlaciones entre la presencia de *TMPRSS2-ERG* en pieza de prostatectomía radical y la concentración plasmática inicial de PSA que presenta el paciente ( $p=0,316$ ), y por otro lado entre el ratio de expresión del gen de fusión en SP y los valores de PSA cada una de las tomas estudiadas ( $p=0,955$ ).



**Figura 55: diagramas de caja que relacionan la presencia de *TMPRSS2-ERG* y la concentración de PSA A) relación entre la presencia del gen de fusión en pieza de PTR con la concentración plasmática de PSA en el momento del diagnóstico ( $p=0,316$ ). B) correlación entre la presencia del gen de fusión en SP y la concentración de PSA en el momento de la toma de la muestra ( $p=0,955$ )**

## 5 DISCUSIÓN



## 5.1.- SIGNIFICADO CLÍNICOBIOLÓGICO DEL GEN DE FUSIÓN *TMPRSS2-ERG* EN CaP.

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo es la caracterización en profundidad *TMPRSS2-ERG* a fin de establecer su potencial papel como biomarcador en CaP. Las pruebas usadas actualmente en el diagnóstico de esta enfermedad distan de ser óptimas; tanto la determinación sérica del PSA como el ERD presentan una notable falta de especificidad y sensibilidad, respectivamente (316). Por su parte, aunque la biopsia prostática se considera el test diagnóstico más fiable, tampoco está exenta de problemas. En primer lugar, se trata de una prueba con una considerable morbilidad asociada en forma de infecciones o retención urinaria en cinco de cada 100 pacientes, y por otro lado, apenas se muestrea un 1% de la glándula prostática en el mejor de los casos, por lo que los falsos negativos y la necesidad de rebiopsias son muy usuales (317).

En cuanto al pronóstico, esta enfermedad también presenta numerosos desafíos. De hecho, los casos de CaP pueden presentar desde un comportamiento indolente por años o décadas, hasta tener un curso fulminante con el desarrollo de resistencia a castración y metástasis en un corto período de tiempo. Como herramientas en la predicción de este comportamiento, actualmente se usan el estadio de Gleason, patológico el TNM, y la concentración sérica preoperatoria de PSA para la composición de unos grupos pronósticos y/o nomogramas predictivos, con resultados francamente mejorables (34, 229, 318). En este contexto hay que destacar que ningún factor molecular se ha podido validar para mejorar estas herramientas pronósticas construidas a base de factores clínico-patológicos. En 2005 surgió un descubrimiento capital. La identificación del gen de fusión *TMPRSS2-ETS* en aproximadamente la mitad de los casos de CaP (185). La especificidad de este gen lo hacían potencialmente ideal para el diagnóstico de CaP. Recientemente se ha desarrollado un método en de detección en orina del ARN del gen de fusión, siguiendo la metodología utilizada para el desarrollo del test diagnóstico para *PCA3*. Amplificación mediada por transcripción (TMA por sus siglas en inglés) al igual que en la determinación de *PCA3* determina la expresión del gen de fusión en forma de ratio con el *PSA* (319). Esta determinación ofrece tasas de 90% de especificidad para la detección de CaP (320). De hecho, La incorporación del score combinado de *TMPRSS2-ERG+PCA3* a la calculadora del PCPT (prostate cancer prevention trial) de riesgo de CaP produjo un beneficio claro al incrementar del 15 al 90% la probabilidad de encontrar CaP en la biopsia y aumentando el AUC de la calculadora de 0,66 a 0,75 (319).

Por ello, se establece como objetivo de la rama retrospectiva de esta tesis la caracterización de *TMPRSS2-ERG*, incidiendo especialmente en su potencial

pronóstico, así como el estudio de la expresión de otros genes relacionados a fin de enriquecer y complementar esta información.

### **5.1.1. Frecuencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.**

La serie retrospectiva analizada en este trabajo comprende 314 muestras FFPE y muestra la fusión génica *TMPRSS2-ERG* en el 52,2% de los casos. Esta frecuencia de detección está dentro del rango reflejado en la bibliografía. En la tabla 71 pueden compararse las frecuencias publicadas en distintos trabajos así como la técnica de detección usada.

Una característica fundamental de esta serie es su homogeneidad, en la que únicamente se han incluido pacientes tratados con PTR sin tratamiento previo (hormonal, braquiterapia, radioterapia o quimioterapia). Otras series publicadas, por el contrario, presentan una selección de pacientes más heterogénea, lo que podría influir en la incidencia de la presencia o expresión del gen de fusión. En cuanto a esta serie, los casos incluidos se caracterizan por un menor cT (sólo 23 casos tienen un estadio clínico mayor que cT2) y pocos casos con afectación ganglionar (sólo 12), reflejando la población que habitualmente se sometía a PTR en el periodo de estudio (1996-2004). No obstante, el número de recaídas bioquímicas (40,8%) y clínicas (23,6%) se sitúa en un rango alto respecto a lo referenciado en la literatura para un seguimiento mediano de 84 meses. Ello podría explicarse por una tasa de márgenes positivos del 48,1% en el periodo incluido. Lo elevado de esta tasa, a su vez, se debe a la optimización de la cirugía urológica desde el año 1996 a la actualidad, y por otro lado al hecho de que durante el periodo de estudio no se realizaban linfadenectomías extensas a los grupos de riesgo alto e intermedio. La concentración sérica de PSA en el momento del diagnóstico está algo sesgada hacia valores menores de 10 ng/ml (58,6%) y en cuanto al estadio de Gleason, el 89,9% de los casos son menores o iguales a 7. Como se acaba de mencionar, el 40,8% de los pacientes (128 casos) han sufrido recaída bioquímica, de los cuales 74 también han progresado localmente (23,6%). Esta serie está caracterizada por estar compuesta por tumores poco agresivos como se puede ver en la descripción de los PCP.

**Tabla 66:** frecuencias del gen de fusión en la bibliografía y técnica empleada en su detección.

<b>Frecuencia <i>TMPRSS2-ERG</i></b>	<b>Técnica de determinación</b>	<b>Características de la serie</b>	<b>Referencia</b>
78%	Nested RT-PCR	Biopsias congeladas	(321)
40-55%	RT-PCR FISH	Especímenes FFPE y congelados provenientes de PTR	(185, 307, 312, 322)
37-54%	FISH	Especímenes FFPE provenientes de PTR.	((323-325)
36- 73%	RT-PCR	Especímenes congelados de casos recurrentes, sin recurrencia e HBP	(217-219, 221, 236)
36%	FISH RT-PCR Secuenciación.	Especímenes FFPE provenientes de PTR	(326)
70%	Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) RT-PCR FISH	Especímenes congelados provenientes de casos localizados y metastáticos sin hormonoterapia.	(232)

FFPE: formalin fixed paraffin embedded; PTR: prostatectomía radical.

El amplio rango de frecuencias del gen de fusión referidas en la bibliografía puede ser debido al uso de diferentes técnicas en la detección mismo. Aunque, por otro lado, también puede influir la heterogeneidad de las series estudiadas tanto en tamaño como en composición (231). En los estudios con características poblacionales y de la muestra más similares al presente trabajo se observan frecuencias muy semejantes a las nuestras (222, 325). Otras causas explicativas de esta variación en la frecuencia podrían ser el volumen tumoral, el número de focos estudiados en cada caso individual, ya que un mismo caso puede tener focos con distintos *status* del gen de fusión, así como el número de isoformas

## DISCUSIÓN

---

del gen de fusión incluidas en cada panel (219) o también la composición de las cohortes y de la zona de la glándula prostática en la que aparece el tumor (327). A fin de obtener información más fidedigna en esta tesis se han analizado las dos isoformas mayoritarias del gen de fusión (T1E4 y T1E5).

Otra posible fuente de variaciones podría ser el grado de progresión del tumor. En la literatura no se han encontrado diferencias significativas entre la incidencia del gen *TMPRSS2-ERG* en CaP localizado no sometido a tratamiento hormonal y CaP metastático resistente a castración (197, 232, 311, 324, 328). La serie analizada en este trabajo, por su naturaleza, no presenta un número muy bajo de metástasis (21 eventos).

Un factor capaz de introducir sesgos en los resultados obtenidos es la técnica usada en la determinación de *TMPRSS2-ERG*. Los procedimientos más extendidos son FISH y RT-PCR (tabla 66). El FISH se considera la técnica de referencia en la detección del gen de fusión en tejido prostático, encontrándose abundantemente referenciada en la literatura (214, 312, 322). Por lo general, se emplean dos aproximaciones básicas en el uso de esta técnica: la mayoritaria es un enfoque *break-apart* y, en menor medida, FISH de tres colores. En el primer caso (222, 225, 307, 325, 329-334) la técnica brinda información cualitativa del reordenamiento pero menos información sobre el mecanismo productor del mismo. A grandes rasgos, este FISH emplea dos sondas flanqueantes a uno de los genes implicados en la fusión. Estrictamente, esta técnica sólo indica que *TMPRSS2* o *ERG* están reordenados. Habida cuenta de que ambos genes están implicados en más genes de fusión, este tipo de sondas no da una información concluyente, aunque por otro lado su valoración es más sencilla.

Por su parte, la técnica de FISH de tres colores se realiza introduciendo otra sonda en la región de 3 Mb situada entre *TMPRSS2* y *ERG*, lo que permite afirmar concluyentemente que el gen de fusión es *TMPRSS2-ERG*. Por este motivo, ha sido la estrategia empleada en esta tesis. Este enfoque fue adoptado por primera vez por Yoshimoto y col. en 2006 (322) y desde entonces algunos otros grupos han optado por esta técnica (335-337) aunque no ha sido la mayoritaria. Para realizar la valoración con sondas tricloros, en este trabajo que se empleó un kit más adecuado para el diagnóstico (sondas poseidon de Kreatech®) perfectamente validado. No obstante, conviene resaltar que se ha obtenido como patrón mayoritario con una señal de triplete Rojo(R) Verde (V) y Azul (A) y otra señal AV. Dado que este patrón no corresponde exactamente con el especificado en el kit como característico de una translocación recíproca (RVA+RV+A), no se puede concluir que estos casos estén reordenados por translocación. Lo más probable es que así sea y por motivos técnicos la señal R sea más difícil de visualizar en este patrón. Aunque, por otro lado, esta señal, también podría ser indicativa de otro reordenamiento sin determinar. A fin de realizar los análisis diferenciales según el mecanismo de reordenamiento a este patrón se le ha asignado el nombre de *Break*.

También ha sido refrendado por la literatura que existen diferencias biológicas en los casos reordenados por deleción intersticial que podrían traducirse en un comportamiento clínico diferente. Por ejemplo, la región de 3 Mb delecionada en el cromosoma 21, entre *TMPRSS2* y *ERG*, contiene 15 genes, algunos de ellos previamente relacionados con cancer: *ETS2*, *PSMG1*, *BRWD1*, *NCRNA00257*, *HMGNI*, *WRB*, *LCA5L*, *SH3BGR*, *C21orf88*, *B3GALT5*, *IGSF5*, *PCP4*, *DSCAM*, *C21orf130*, *MIR3197*, *BACE2*, *PLAC4*, *FAM3B*, *MX2* y *MX1*. Por tanto es interesante el realizar un análisis diferencial de PCP, expresión génica y proteica y supervivencia según el mecanismo de reordenamiento estudiado mediante FISH. En esta serie los casos reordenados con un patrón de *break* presentan una mayor incidencia de infiltración perineural. En otros trabajos se ha relacionado el reordenamiento por deleción intersticial con un mayor cT (312). Los resultados de nuestra serie no confirman estas observaciones, lo que puede ser debido a que en la mayoría de trabajos se ha usado una estrategia de break-apart (129, 130, 208, 307, 311), mientras que en nuestro caso se ha empleado esta nueva aproximación de sondas tricolor.

En aras de obtener una información de mayor calidad y de responder a uno de los objetivos de la presente tesis, se ha analizado el gen de fusión en todas las muestras por FISH y RT-PCR en paralelo a fin de comprobar la validez, sensibilidad y especificidad de ambas técnicas, para posteriormente analizar las implicaciones pronósticas de la presencia de *TMPRSS2-ERG*. Hemos analizado los casos portadores de la translocación siendo ésta detectada por ambas técnicas y/o por cada una de ellas de forma individual. A este respecto, en la comparación entre ambas técnicas, de manera similar a la llevada a cabo en otros contextos (338, 339), se ha obtenido una sensibilidad del 84% y una especificidad del 85% de la RT-PCR, tomando el FISH como técnica de referencia (artículo en prensa). El FISH es la técnica de elección para detectar genes de fusión entre otros motivos porque al respetar la arquitectura tisular aporta información morfológica (338, 340, 341). Sin embargo la RT-PCR es más económica y rápida. Por esto, es interesante la comparación de ambas técnicas en el diagnóstico de neoplasias caracterizadas por reordenamientos génicos (338, 342, 343). El nivel de concordancia es del 81% en nuestra serie. En la bibliografía existe un consenso bastante amplio en la equivalencia del uso de ambas técnicas en la detección de los genes de fusión, lo que coincide con los hallazgos de la presente tesis. De hecho la técnica de RT-PCR está integrada en la rutina del diagnóstico clínico de numerosas neoplasias como *BCR-ABL* en leucemia mieloide crónica (241, 344) o la detección del reordenamiento *Colla1-PDGFR-beta* en dermatofibrosarcoma protuberans (339). Lo más recomendable en el uso clínico es el uso combinado de ambas técnicas que ofrece unos mejores valores de sensibilidad y especificidad.

No obstante, el FISH aporta información a niveles a los que RT-PCR no puede hacerlo. A nivel genómico, aporta información sobre la clonalidad del tumor y es aplicable sobre muestras más pequeñas (por ejemplo obtenidas de biopsias (334). Se han usado técnicas derivadas de la PCR para estudiar el transcrito del gen de fusión e indirectamente, por tanto, el mismo ADN nuclear. Ahora bien, existen

varios motivos para estudiar este reordenamiento a nivel genómico. Por ejemplo, muchos trabajos han relacionado características clinicopatológicas del CaP con propiedades de la fusión que no pueden analizarse con PCR convencional o por estudios de expresión, como por ejemplo la forma de reordenamiento (translocación no compensada o deleción intersticial). También se ha publicado que la fusión podría expresarse en fases tempranas del CaP, pero no en las tardías (191). Y por otro lado la RT-PCR es más sensible a contaminación cruzada. Todo ello hace que sea conveniente un nivel adicional de análisis genico.

### **5.1.2. Gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y asociación clinicopatológica.**

En esta serie no se ha puesto de manifiesto ninguna correlación entre el mecanismo de reordenamiento (deleción intersticial o *break*) con ninguno de los PCP o la supervivencia, Attard y cols. definieron un grupo de mal pronóstico los casos portadores de *TMPRSS2-ERG* por deleción intersticial y que además contaban con una duplicación del material genico (311). En cambio, otros autores no han sido capaces de reproducir esta asociación en relación con la deleción intersticial, pero sí con el número de copias (335). Otros autores también han asociado la deleción intersticial con la presencia de metástasis (324), sugiriendo que este mecanismo de reordenamiento cromosómico se asocia con un comportamiento más agresivo del tumor. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos hallazgos han sido refrendados con una serie de validación.

En referencia a las implicaciones de la presencia del gen de fusión (determinado por FISH y/o RT-PCR), en nuestra serie se reproduce la relación encontrada entre el reordenamiento por *Break* y la infiltración perineural. Este parámetro indica la presencia de células tumorales en el perineuro (cubierta nerviosa), que constituye una de las vías de escape de la cápsula prostática usadas por el tumor para diseminarse a distancia. Pese a que este parámetro debería indicar mal pronóstico, no existe consenso a este respecto (345, 346) y en general es una variable que pierde su poder pronóstico en los estudios multivariados frente a PCP clásicos como el Gleason score o el estadio patológico. De entre los trabajos que relacionan la invasión perineural con *TMPRSS2-ERG* no se ha objetivado una relación directa con un mal pronóstico (212, 217).

En el presente estudio no se ha encontrado relación entre *TMPRSS2-ERG* y la SLPB o SLP. En la literatura no existe consenso respecto a las implicaciones pronósticas de la presencia de *TMPRSS2-ERG*. Algunos estudios relacionan la presencia del gen de fusión con mal pronóstico, concretándose una relación con un mayor estadio clínico (202, 312) o bien con un mayor score de Gleason (326) o una menor SLPB (233). Sin embargo, otros correlacionan la presencia del gen de fusión con un pronóstico favorable (196, 236, 347). Como en nuestro caso, otros autores, no encuentran relación con el pronóstico (199, 232, 323). En todos estos trabajos, la identificación del gen de fusión se ha realizado sobre piezas de prostatectomía radical. Estos resultados discordantes pueden deberse a que la influencia del gen de

fusión en el pronóstico es sutil y el uso de distintas técnicas, composición de las series o técnicas de análisis pueden sesgar los resultados.

Como se puede ver a la luz de las series publicadas, la presencia del gen de fusión se encuentra en aproximadamente la mitad de los casos de CaP, probablemente definiendo dos subgrupos moleculares de la enfermedad que nuestro grupo ha demostrado tienen un distinto panel pronóstico de (217). Ahora bien, las implicaciones de la presencia o ausencia de la fusión en cuanto a pronóstico y supervivencia distan mucho de estar completamente elucidadas. Es necesario mucho más trabajo a fin de clarificar las posibles contribuciones pronósticas de la presencia del gen de fusión en el CaP.

### **5.1.3. Otros biomarcadores de progresión en CaP y asociación clinicopatológica.**

Por otra parte, cabe señalar que el uso de biomarcadores de expresión génica en el CaP es un campo en expansión, por lo que uno de los objetivos planteados en este trabajo fue la validación de distintos potenciales biomarcadores. Los genes estudiados se seleccionaron en función de su relación con fusiones génicas *TMPRSS2-ETS* o bien por estar reseñados en la bibliografía como implicados en la progresión del CaP, y son: *TMPRSS2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *PCA-3*, *HEPSIN*, *PAR-2*, *GSTP-1*, *AMACR* y *Cav-1*.

La expresión génica de *TMPRSS2*, *ERG*, *ETV1* y *ETV4* en tejido tumoral prostático está condicionada en la mayoría de los casos por la presencia de fusiones *TMPRSS2-ETS* (185, 208). Por ello, en el presente trabajo, se ha medido la expresión de estos cuatro genes en dos regiones génicas: uno por delante del punto de reordenamiento (en 5') y otro por detrás (en 3'). En un estudio publicado en 2008, se describe la determinación indirecta de la presencia del gen de fusión midiendo la expresión génica de *ERG* en distintos puntos usando un *array* de expresión exónica (348). Según nuestros resultados, *ERG* presenta una expresión de 0,247 por delante del sitio de translocación y de 1,79 por detrás, evidenciando el efecto de la fusión génica, si bien en el caso de *TMPRSS2* no es tan evidente mostrando una expresión prácticamente similar en ambos puntos (2 y 2,29).

La expresión de los exones 2 y 3 de *TMPRSS2* correlaciona positivamente con la presencia de PIN y negativamente con la infiltración perineural, mientras que la sobreexpresión de los exones 7 y 8 correlaciona directamente con el estadio clínico. Considerando que de entre todos estos parámetros, cT es el que aporta mayor información pronóstica, puede decirse que la sobreexpresión de este gen podría estar relacionado con CaP extraprostáticos al diagnóstico. En numerosas referencias bibliográficas, al igual que sucede con la expresión de *ERG*, se asume la sobreexpresión de estos genes directamente con la de *TMPRSS2-ERG* y por tanto sus implicaciones pronósticas siguen generando controversia [para revisión (208)]. Por otro lado, Lucas y cols. encuentran esta proteína consistentemente sobreexpresada en adenocarcinoma prostático (189)

La expresión de los exones 9 y 10 de *ERG* por encima de la mediana está correlacionada con un mayor cT y pT y por tanto con un mal pronóstico. Como este gen se encuentra generalmente hipermetilado tanto en tejido prostático normal como tumoral (349) su sobreexpresión está condicionada por la presencia de *TMPRSS2-ERG*. En numerosas referencias bibliográficas se han encontrado correlaciones de la expresión de este gen con distintos PCP. Varios grupos han publicado resultados coherentes con los obtenidos en esta tesis: Ribeiro y cols también correlacionan la expresión de *ERG* con un mayor pT (336), otra serie encuentra relación entre la sobreexpresión de este gen con un mayor pT y cT (350). Por otro lado, se encuentran los trabajos de Minner y cols. que no encuentran relación entre la expresión de *ERG* con ningún parámetro pronóstico (351); aunque no ponen de manifiesto una relación estadística, sus datos presentan una tendencia hacia mayores pT y estadio de Gleason. Por otro lado, un trabajo de 2005 indicaba que esta sobreexpresión de *ERG* se relacionaba con un mayor ILPB (196), por su temprana fecha de publicación no tuvo en cuenta la presencia de *TMPRSS2-ERG* y analizaba exclusivamente la sobreexpresión de este gen como biomarcador en CaP. Existe controversia acerca del valor pronóstico de la expresión de *ERG* en CaP; una positividad alta a la proteína ERG se asoció Gleason bajo, mayor supervivencia global y un mayor tiempo en desarrollo de resistencia a la castración (352). Sin embargo, en una cohorte de 481 pacientes provenientes del ERSPC (European randomized study of screening for prostate cancer), la expresión de *ERG* (65% de los casos) no se relacionó con ninguna de las variables patológicas clásicas ni con la supervivencia libre de progresión bioquímica (353).

La expresión de *ETV4* está relacionada con la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ETV4*. Esta isoforma, con una incidencia menor del 2% (354), conllevaría que su sobreexpresión quedara muy diluida en el conjunto de datos aquí presentados. Por esto unos niveles bajos de expresión como los de esta tesis (0,4) son esperables. Por otro lado Hollenhorst y cols. publicaron que la expresión de este gen contribuye a la transformación y movilidad de la línea celular de CaP PC3, aunque dicho efecto puede ser llevado a cabo también por otros genes de la familia ETS (355) que sugiere que los efectos provocados por estos factores de transcripción pueden ser intercambiables. De hecho, la presencia de los genes de fusión es excluyente, es decir, no se han encontrado casos de reordenamientos simultáneos entre *TMPRSS2* y miembros de la familia ETS. Este perfil de la familia ETS también está presente en sarcomas de Ewing, caracterizados por genes de fusión en los que se ve implicada esta familia génica (356, 357). En este trabajo la expresión de *ETV4* correlaciona inversamente con la presencia de infiltración perineural; a día de hoy se conoce poco la relación entre la expresión de *ETV4* con PCP clásicos.

Una vez discutido el rol de los genes implicados en las fusiones génica *TMPRSS2-ERG*, es también objetivo de esta tesis caracterizar otros potenciales biomarcadores moleculares implicados en CaP. Sin duda, el más validado de estos nuevos marcadores es *PCA3* (anteriormente denominado *DD3*). Se trata de un gen que codifica un ARNm no traducible que presenta una sobreexpresión

característica en CaP (incluso metastático), respecto al tejido prostático normal y a la hiperplasia prostática benigna (166). En esta serie el nivel de sobreexpresión de este biomarcador es de 43,41 veces la del tejido prostático normal, niveles levemente inferiores a los referenciados en la literatura científica (164). Desde el año 2006 Progenesa™ comercializa un kit diagnóstico para cuantificar la expresión de este gen en muestras de orina (358). Dicho kit se usa en la actualidad en la rutina clínica para indicar biopsias o rebiopsias prostáticas en casos en los que los marcadores diagnósticos clásicos ofrecen dudas para la indicación o no de una biopsia prostática (359). En Febrero de 2012 la FDA aprobó el uso de este biomarcador para establecer la indicación de una biopsia de repetición en pacientes con sospecha de CaP y con una primera biopsia negativa. Aunque sigue existiendo controversia respecto al punto de corte de esta prueba (360) actualmente está aceptado un ratio de 35, pero la tendencia en su uso y en su inclusión en nomogramas de indicación de biopsia es que el punto de corte sea inferior (179, 361). En un trabajo publicado por nuestro grupo se refrendan estos hallazgos en una serie de pacientes españoles con sospecha de CaP. Aplicando un punto de corte de 35 se ahorraron el 49% de nuevas biopsias, siendo especialmente efectiva esta prueba para la indicación de primeras biopsias (180). En esta serie la sobreexpresión de PCA3 correlaciona con un estadio de Gleason 7, y con mayor concentración sérica de PSA en el diagnóstico. Análogamente, van Poppel y cols. correlacionan la expresión de este gen con un mayor estadio de Gleason, estadio clínico y con una biopsia significativa (siguiendo el criterio de Epstein) (362).

*Hepsin (TMPRSS1)* es una proteína de membrana de tipo II con un dominio extracelular de actividad serín proteasa, cuya expresión diferencial entre tejido tumoral y normal es 4,97 en este trabajo, dato que coincide con numerosas referencias en la (126, 363, 364). Una de las principales características de este biomarcador es una sobreexpresión en CaP y PIN frente a tejido prostático normal (363, 365-367). Por otro lado, la expresión de este gen también tiene implicaciones pronósticas. En el presente estudio se pone de manifiesto una relación directa entre la sobreexpresión de *hepsin* y el estadio de Gleason, el PSA inicial, el estadio patológico, la infiltración perineural y la progresión bioquímica, mientras que la relación es inversa con la presencia de PIN, con lo que este gen es el biomarcador más rentable en el pronóstico del CaP de todos los analizados. Su nivel de expresión y el gran número de PCP con los que está relacionado le hacen candidato al uso como biomarcador pronóstico solo o formando parte de un panel. En un trabajo publicado en 2011 encuentran relación entre la expresión de *hepsin* medida por IHQ, el estadio de Gleason y los niveles de PSA sérico (366), mientras que el grupo de Stamey incide en la relación entre la expresión de *hepsin* con el *score* de Gleason (368). Funcionalmente este gen está implicado en la progresión y metástasis del CaP (124)

*PAR-2* codifica para un receptor activado por proteasas, cuya sobreexpresión se ha descrito en CaP y ha sido implicado en la proliferación y metástasis de distintos tipos de tumores (369, 370) y en HBP (Mannowetz, Wurdinger et al. 2010). En nuestra serie no se han detectado alteraciones en la

expresión de este gen, estando relacionada inversamente dicha expresión con la presencia de infiltración perineural. Esta contradicción puede deberse al bajo número de eventos de metástasis en nuestra serie que puede introducir un sesgo en los resultados. De hecho, en otros trabajos su expresión está muy condicionada a estos eventos. (Black, Mize et al. 2007) (Wilson, Greer et al. 2005)

La hipermetilación de las islas CpG de la región promotora del gen detoxificador de productos de oxidación *GSTP-1*, induce una infraexpresión de este gen muy característica en tumores prostáticos (113, 371-373), pero no en HBP ni en PIN (374) [para revisión (375)]. En nuestra serie, se pone de manifiesto este comportamiento con un valor relativo de expresión de 0,361 veces el de la próstata normal. A nivel pronóstico se pone de manifiesto una correlación inversa entre la expresión de *GSTP-1* y la presencia de infiltración perineural y con el ILPB. En este sentido, en la literatura se relaciona el grado de metilación de *GSTP-1* con el *score* de Gleason y el estadio clínico (109). Este biomarcador también es prometedor, pero técnicamente es más factible su determinación por detección de la hipermetilación que por expresión, dado que es más fácilmente detectable y concluyente la determinación de la primera que de la segunda por qRT-PCR.

*AMACR* codifica para la  $\alpha$ -Metil Coenzima A Racemasa encargada de la metabolización de ácidos grasos de cadena larga. Su sobreexpresión en tejido tumoral se puso de manifiesto, en primer lugar, en un metanálisis sobre experimentos de expresión de alto rendimiento (376). En estudios de validación se comprobó la capacidad discriminativa de este biomarcador entre tejido normal y tumoral (377) y por otro lado con PIN. Cuantitativamente, la expresión de este gen va aumentando en PIN y en mayor medida en tejido tumoral prostático (378). En este sentido, nuestro trabajo presenta unos resultados concordantes con los reflejados en la literatura, con un nivel de expresión de *AMACR* 3,23 veces mayor en CaP que en tejido normal prostático. A nivel pronóstico, esta expresión correlacionó con una mayor concentración de PSA en el momento del diagnóstico y un mayor estadio patológico y clínico y curiosamente con una menor tasa de recaída bioquímica. Por tanto, netamente, la expresión de este gen, además de discriminar entre tejido normal y tumoral, parece estar relacionado con mal pronóstico. Gumlec y cols. llegan a una conclusión similar en un trabajo en el que analizaban líneas celulares, en las que la sobreexpresión de *AMACR* era más acusada en especímenes con un *score* de Gleason de 9 ((379).

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática en forma de omega. En 1992 se descubrió el primer biomarcador proteico derivado de estas estructuras, al que se le denominó Caveolina-1. En la actualidad se ha implicado a esta proteína en diversas funciones; transporte vesicular, homeostasis del colesterol y supresión de la transformación celular, entre otras (380). En un entorno tumoral, este gen se comporta de forma diferente según el tipo celular considerado: mientras que en cáncer de pulmón, mama y sarcomas mesenquimales está generalmente infraexpresado (en sarcomas de Ewing puede sobreexpresar) (381, 382), en tumores de vejiga, esófago y próstata se encuentra sobreexpresado (383, 384). No

obstante, en este último tipo también se da una baja expresión en células privadas de andrógenos (385). En nuestra serie, *Cav-1* muestra una expresión relativa de 0,612, similar al nivel de expresión determinada por Bachmann y cols. en una serie de tumores prostáticos no privados de andrógenos (386). Más concretamente, también se ha descrito sobreexpresión de este gen en fibroblastos asociados en metástasis de carcinomas y melanomas (387). De hecho, se ha descrito sobreexpresión de *Cav-1* tanto en tumores primarios como en metástasis de CaP (388). En términos más generales, este gen funciona como regulador negativo de la transformación y tumorigénesis mamaria. En próstata, su funcionamiento parece ser el contrario, de promotor tumoral [para revisión (380)]. También se ha postulado que en tejido tumoral *Cav-1* tiene efecto antiapoptótico, mientras que en mama tiene el efecto contrario lo que podría deberse a los distintos inductores de apoptosis que actúan en cada tejido (389). En cuanto a las implicaciones pronósticas de la expresión de este gen, en esta serie correlaciona inversamente con el score de Gleason y el estadio patológico. Resultados análogos se obtienen en un artículo publicado en 2011 en el que la expresión de este gen correlaciona inversamente con el estadio de Gleason y con pT (390). Este comportamiento podría deberse a que la expresión de *Cav-1* en el estroma tumoral es muy alta, de modo que grados de Gleason o estadios más avanzados se asociarían con una baja expresión de *Cav-1*, como consecuencia de una pérdida de estroma tumoral. Este efecto se pone de manifiesto en esta serie ya que las muestras se extraen de cortes de tejido que comprenden tanto el tumor como su tejido estromal adyacente y se analiza la expresión génica por medio de qRT-PCR, es decir se mide la expresión media de todas las células presentes en los cortes. En otros trabajos, la sobreexpresión de *Cav-1* está relacionada con la presencia de metástasis, recaída biológica y resistencia a castración (391) y también con el *score* de Gleason, pT, afectación ganglionar y con un menor ILP (392). Funcionalmente, se ha descrito que la mutación o infraexpresión de este gen combinada con otras mutaciones puede conferir a la célula un fenotipo neoplásico y que la infraexpresión de este gen es concomitante a la de *p53* (393). Por último, la expresión de *Cav-1* puede regular la actividad de PTEN, ya que ambas proteínas forman complejos proteicos que unen a ambas proteínas a la membrana de las caveolas (394).

Integrando todos los hallazgos anteriores, existen numerosos trabajos que ponen a punto paneles de biomarcadores que aportan información pronóstica sobre el CaP basándose bien en la expresión génica (229, 395), en conjuntos de SNP que definen variantes génicas con implicaciones pronósticas (396), con PCP (397) o bien con la expresión de proteínas (398).

La comparación de perfiles de expresión obtenidos con microarrays permite descubrir genes diferencialmente expresados entre dos condiciones como tejido sano y tumoral. Otros ejemplos de este enfoque serían diagnóstico inicial, evaluación del subtipo de la enfermedad, monitorización de respuesta al tratamiento y predicción de recaídas. Los experimentos con microarrays suelen mostrar como resultado perfiles con la expresión de decenas a miles de genes.

## DISCUSIÓN

---

Ahora bien en la validación técnica y biológica de estos experimentos, únicamente unos pocos genes acaban resultando como biomarcadores potenciales (399, 400).

En cuanto a las aplicaciones de estas técnicas, un aspecto muy estudiado con este tipo de experimentos es el potencial diagnóstico de los mismos. La incorporación de perfiles de expresión a los algoritmos diagnósticos refina la información obtenida y puede ser decisiva en casos dudosos. Kosari y cols. desarrollaron un panel de dos genes; *CCNBI* está característicamente sobreexpresado en CaP mientras que *NACA* infraexpresa (401). En un segundo trabajo se desarrolla un panel con 114 genes según las características del estroma que rodea al tumor, por lo que no sería necesaria la inclusión de células tumorales en las biopsias, disminuyendo los falsos negativos por contaminación con tejido peritumoral (402). Por último, en un trabajo de 2004 se describe un perfil génico útil en el diagnóstico de CaP sin interferencias del tejido estromal adyacente (403).

Otra aplicación de los perfiles de expresión génica es la monitorización del tratamiento ya sea en el ámbito de la rutina clínica o bien en ensayos clínicos. Un ejemplo sería el perfil de expresión en casos no respondedores a docetaxel en CaP resistente a castración (404). También se ha publicado un perfil asociado a resistencia a quimioterapia con dasatinib en líneas tumorales derivadas de CaP (405).

Quizás el ámbito de aplicación más interesante para este tipo de técnicas sea el pronóstico. Los algoritmos usados en la actualidad en tumores prostáticos son valiosos pero mejorables, por lo que sería muy útil disponer de información adicional. Ping y cols. desarrollaron un perfil compuesto por la expresión de 70 genes que predicen la agresividad del tumor. Entre ellos están *AMACR*, *hepsin*, *GSTP-1* y *Cav-1* (406). En un trabajo reciente, se encontró un perfil de expresión diferencial de 128 genes en casos resistentes a castración. Curiosamente, sólo 24 de ellos están directamente regulados por andrógenos. En este mismo trabajo se encontró una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación en casos portadores de *TMPRSS2-ERG* (407). Otra firma de 132 genes predice metástasis en tumores murinos, tres de los cuales son posibles marcadores de progresión bioquímica en humanos (188). Por otro lado, han sido descritos genes diferencialmente expresados en casos con un estadio de Gleason de 7 (408). En este sentido se han encontrado 667 genes cuya expresión discrimina entre casos con *score* de Gleason de 6 y otros de 8 (409). Por último, Markert y cols. establecieron perfiles de expresión: el grupo de peor pronóstico se caracteriza por la expresión de genes característicos de células madre e inactivación de *p53* y *PTEN*; un segundo grupo enriquecido en la expresión de *TMPRSS2-ERG* presenta un pronóstico intermedio y 3 grupos más favorables (410).

En esta tesis se ha establecido un perfil de expresión de genes previamente relacionados con el CaP con implicaciones pronósticas. Por un análisis de clústers no supervisados nuestra población se divide claramente en tres grupos; uno de ellos se asocia a factores de peor pronóstico (mayor cT, pT y presencia de infiltración

perineural), además de tener mayor presencia de *TMPRSS2-ERG*. Ello podría indicar indirectamente que la presencia del gen de fusión es marcador de mal pronóstico, aunque no se ha obtenido confirmación directa de este hecho cuando se lleva a cabo el estudio univariable de supervivencia frente al ILPB e ILP.

También se ha hipotetizado que la presencia de *TMPRSS2-ERG* podría constituir dos subgrupos molecularmente independientes en CaP caracterizados por un distinto perfil transcriptómico. Setlur y cols (228) encuentran que el CaP que porta el gen de fusión está relacionado con la vía de señalización de los receptores estrogénicos y, además, los casos han sido estratificados según perfiles de expresión con valor pronóstico. Uno de ellos está relacionado con *TMPRSS2-ERG*. En otro trabajo se usa esta aproximación para descubrir nuevos biomarcadores en CaP (411). En un reciente trabajo de expresión diferencial descubrió que los casos portadores del gen de fusión tenían una expresión de *CRISP3*, que codifica para una proteína secretora rica en cisteína presente en neutrófilos y plasma seminal (412), 50 veces mayor que los casos no portadores (336).

Todos los estudios mencionados seleccionan los genes candidatos por análisis de *microarrays*, por lo que partiendo de un conjunto de cientos de miles de genes elaboran perfiles de unos cientos o miles de genes diferencialmente expresados que luego validan por qRT-PCR o por *Western blot*. En esta tesis se parte de genes referenciados en la literatura como característicos de tumores prostáticos o bien relacionados con el gen de fusión y se analizan por qRT-PCR. Posteriormente se agrupa su expresión para relacionarla con PCP y de supervivencia. Por tanto, los resultados no son equiparables, ya que en cada trabajo se usa una metodología y unas muestras distintas. Pero principalmente porque no hemos empleado los resultados obtenidos en experimentos de *microarrays* como generadores de hipótesis. No obstante, la integración de varios marcadores en el pronóstico del CaP puede ayudar considerablemente en el manejo clínico de la enfermedad, y la determinación de unos pocos biomarcadores por qRT-PCR es más factible en la práctica clínica que el uso de *microarrays* de expresión.

Otra aproximación en el estudio de biomarcadores ampliamente extendida en el ámbito hospitalario, por su reducido coste y factibilidad, es la inmunohistoquímica (IHQ). Aunque en la actualidad no son rutinarios en la práctica clínica habitual, a nivel investigacional se han descrito muchos, pero la falta de métodos estandarizados en la técnica y valoración de esta técnica, y por otro lado a un diseño inadecuado de los estudios con poca muestra y *end-points* inadecuados hace que estos biomarcadores no hayan alcanzado un uso clínico (413).

Para nuestro estudio, se ha analizado la expresión de PTEN, Ki-67, Caveolina-1, CD-99 y TPD52. De estas proteínas, la más ampliamente relacionada con CaP es la pérdida de PTEN (147, 153, 154). *PTEN* está frecuentemente inactivado en CaP, lo que implica una pérdida de su proteína. Esta inactivación puede deberse tanto a la pérdida de un alelo o a un silenciamiento epigénético. La

## DISCUSIÓN

---

expresión génica de *PTEN* es muy importante para la iniciación y progresión del CaP, además este gen puede coactuar con otros como *p27* y *p53* (*TP53*) para promover la tumorigénesis en la próstata (199, 414). No obstante, en la serie estudiada no se ha relacionado la pérdida de expresión de esta proteína con ninguno de los PCP analizados.

El mismo comportamiento han mostrado Ki-67 y TPD52. La primera de estas proteínas es un marcador de proliferación celular cuya sobreexpresión se ha relacionado con una mayor agresividad de tumores prostáticos (415). En cuanto a pronóstico los resultados publicados son contradictorios, Nikoleishvili y cols correlacionan la expresión de esta proteína con el estadio tumoral (416) mientras que otro grupo no encuentra relación entre la expresión de esta proteína y la recaída bioquímica en CaP (417). Otro trabajo relaciona la expresión de Ki-67 con una menor supervivencia libre de recaída (418).

La sobreexpresión de TPD52 está relacionada con amplificaciones en 8q características del CaP (376). Esta proteína actúa protegiendo a las células tumorales prostáticas de la apoptosis inducida por la deprivación de andrógenos por la vía Stat3/Bcl2. Aumentándose, por tanto, la proliferación y la invasividad en la línea celular LNCaP (419, 420). Aunque en nuestra serie se relaciona la sobreexpresión de esta proteína con una menor progresión clínica, hay dos características que hacen no extrapolables estos resultados con los referenciados en la literatura científica. En primer lugar, los trabajos publicados analizan la función proteica *in vitro*; y en segundo lugar, la composición en los trabajos referenciados las células tumorales evaden la apoptosis inducida por la deprivación hormonal lo que indica una mayor relevancia en CaP resistente a castración, comportamiento que en esta serie no está representado. También pueden influir factores derivados de la expresión IHQ anteriormente citados (falta de estandarización en la técnica y análisis).

En cuanto a la expresión de Cav-1, a fin de refinar el análisis se ha medido en paralelo con dos acs de distintas casas comerciales; uno de Santa Cruz (SC) y el otro de BD. En la determinación con el ac de BD no se pone de manifiesto ninguna relación significativa con PCP. No obstante, la expresión de la proteína medida con el ac SC correlaciona con PCP de buen pronóstico como una concentración inicial de PSA y una presencia de progresión clínica menores coincidiendo con los datos derivados de la expresión génica de este biomarcador.

Uno de los objetivos del presente estudio es demostrar si el CaP tiene un comportamiento diferente en función del estatus del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. En este sentido se llevó a cabo un estudio de supervivencia estratificando los casos en función de esta característica y encontrando distintos factores pronósticos independientes. Así, la serie global tiene como factores de mal pronóstico de recaída bioquímica el estadio de Gleason, la concentración de PSA en el momento del diagnóstico y la presencia de infiltración perineural.

Por otro lado, los casos que no portan el gen de fusión presentan valor pronóstico independiente; la concentración inicial de PSA, cT y la infiltración perineural mientras que los casos portadores de *TMPRSS2-ERG* el *score* de Gleason, la concentración de PSA en el diagnóstico y la expresión de *GSTP-1* y *TPD52* se definen como factores pronósticos independientes de recaída bioquímica (ver Tabla 57 Resultados). En un trabajo de nuestro grupo usando la misma metodología se describió un comportamiento análogo con el ILPB definido por el *score* de Gleason, cT y la presencia de márgenes quirúrgicos en casos sin el gen de fusión y la concentración inicial de PSA, el estadio de Gleason y los márgenes quirúrgicos en casos portadores de *TMPRSS2-ERG* (217).

Estos hallazgos previamente publicados por nuestro grupo sobre una serie de 226 casos de PTR sin tratamiento previo se confirman parcialmente en la presente tesis. Entre ambos trabajos hay dos diferencias. En primer lugar, la serie presentada en esta tesis es mayor, con todos los casos tratados de inicio con PTR sin hormono, quimio, braqui o radioterapia. En segundo lugar en esta tesis se han incorporado al análisis de supervivencia parámetros de expresión génica y proteica lo que explica las diferencias entre los perfiles pronósticos. En ambos trabajos, cT es un factor diferencial entre ambos grupos. El estadio de Gleason pasa a tener valor pronóstico independiente en el grupo de casos portadores del gen de fusión, y en este grupo hay dos nuevos factores derivados de los datos de expresión: el gen *GSTP-1* y la proteína *TPD52*.

En el análisis de supervivencia multivariante de la serie global con respecto al ILP son factores de riesgo independientes el estadio de Gleason, la expresión de Caveolina-1 medida con el ac de SC y la expresión de *TPD52*. Los casos que no portan el gen de fusión presentan como factores pronósticos la presencia de infiltración perineural y la expresión de Ki-67. En los casos portadores de *TMPRSS2-ERG* tienen valor pronóstico en el análisis multivariante, el *score* de Gleason, la concentración inicial de PSA y la expresión de Cav-1 medida con el ac de SC (ver Tabla 62 Resultados). Conviene tomar estos resultados con precaución porque el seguimiento de esta serie es corto para análisis de supervivencia respecto a la recaída clínica; dado que hay 74 eventos (23,6%) de progresión clínica frente a 128 (40,8%) de progresiones bioquímicas. Por otro lado los datos de expresión de Cav-1 SC y de *TPD52* están poco compensados, con un 96,7% y un 98,6% respectivamente presentando expresión IHQ, por lo que estos datos sesgan el estudio multivariante influyendo en el resto de factores incorporados en la regresión de Cox.

Siguiendo dentro del campo del pronóstico en el CaP, es muy interesante la incorporación de nuevos biomarcadores en protocolos de vigilancia activa (VA) e-n esta enfermedad. Debido a la detección cada vez más precoz de los tumores prostáticos (desde la introducción del test del PSA) y al lento crecimiento de este tipo de tumores. El CaP es un candidato ideal a estrategias más conservadoras en el manejo clínico de la enfermedad (421). Así, la VA se define como un protocolo de estrecho seguimiento clínico en pacientes en que la evidencia clínica indica que el

cáncer sigue un curso lento [para revisión (422)]. Este tipo de manejo clínico cuenta con la evidente ventaja de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Desafortunadamente, a día de hoy carecemos de biomarcadores que permitan distinguir con total seguridad pacientes con tumores de crecimiento lento de otros que requieren de tratamientos más agresivos (cirugía, braqui o radioterapia). En este sentido se ha propuesto que el test en orina de *PCA3* puede ser de ayuda identificando pacientes que se puedan beneficiar de la VA (Nakanishi, Groskopf et al. 2008), pero sus resultados son contradictorios en relación a la supervivencia libre de biopsias con criterios de progresión patológica. En la presente tesis se ha puesto de manifiesto que el estadio de Gleason junto con la expresión de *GSTP-1* tienen un valor predictor pronóstico independiente y significativo en casos portadores de *TMPRSS2-ERG* (HR de 15,62 de ambos parámetros en combinación en un análisis multivariante de supervivencia). Este hecho es especialmente interesante en el contexto de la indicación de la VA. De hecho, dentro de los casos con un grado de Gleason de 7, los casos portadores del gen de fusión con sobreexpresión de *GSTP-1* podrían ser candidatos a VA mientras que los que infraexpresan este gen probablemente requerirían un tratamiento más agresivo. Estos prometedores resultados deben confirmarse en estudios de validación que podrían confirmar la expresión de *GSTP-1* y la presencia del gen de fusión como valiosos biomarcadores en el pronóstico del CaP.

Otro interesante aspecto en el CaP es el análisis de las posibles diferencias entre los tumores que sólo recaen bioquímicamente de los que sufren progresión clínica. No todos los tumores prostáticos con recaída bioquímica desarrollan una progresión a nivel clínico (como una recidiva en forma de tumor localizado). Se considera que aproximadamente un 40% de los casos en que aumentan los niveles de PSA progresan localmente (423). También se considera que la probabilidad de permanecer libre de enfermedad a los 5 años tras una prostatectomía radical oscila entre el 77% y el 80% (29). Otras series, en cambio, han estudiado esta probabilidad en casos clínicamente favorables y en otros tumores con un fenotipo más agresivo siendo de un 75% y un 37% respectivamente (424). En la serie estudiada en esta tesis compuesta por 314 casos; 128 (40,7%) recayeron bioquímicamente, de los cuales 73 (57%) progresan clínicamente también. Se analizaron los PCP, de expresión génica y proteica a fin de intentar elucidar un panel pronóstico diferencial en los casos que progresan. Sólo se encontraron tendencias sin alcanzar la significación estadística de la progresión clínica con la sobreexpresión de la parte proximal de *TMPRSS2* (exones 2 y 3), así como con la expresión de Cav-1 con el ac de SC.

Es resaltable que a nivel pronóstico el CaP presenta unos factores de riesgo independientes según si presenta o no el gen de fusión, lo que es indicativo de que las consecuencias de este reordenamiento génico trascienden la mera biología para definir subtipos de la enfermedad con implicaciones en el manejo clínico de los pacientes. Los hallazgos de perfil diferencial obtenidos en nuestro trabajo previo (217) se confirman, y enriquecen añadiendo mayor número de casos y se refinan incorporando nuevos parámetros relacionados con la expresión génica y proteica de

biomarcadores relacionados con el CaP, abriendo el campo para la determinación sistemática y rutinaria de nuevos biomarcadores para el mejor manejo clínico del CaP.

La combinación de los PCP clásicos con la presencia de *TMPRSS2-ERG* pueden ser de mucha ayuda en el pronóstico del CaP, y su combinación con otros biomarcadores moleculares probablemente determine una información pronóstica mucho más tangible que la aportada de forma individual. De hecho, en un metaanálisis reciente la expresión de *TMPRSS2-ERG* se asocia con cT en el momento del diagnóstico, pero no encontraron relación directa con el ILPB, ILP o la supervivencia global (425).

### **5.2.- UTILIDAD DIAGNÓSTICA DEL GEN DE FUSIÓN *TMPRSS2-ERG* EN LA DETECCIÓN DE CTC EN CaP.**

El objetivo de esta parte de la tesis es el desarrollo de una técnica para cuantificar CTC de CaP y su correlación con los principales PCP. Actualmente, el principal factor pronóstico del curso clínico en pacientes con CaP es su clasificación TNM, consistente en determinar la extensión de la enfermedad, estableciendo la localización primaria (T), la afectación de los ganglios regionales (N) y de metástasis a distancia (M). Este estadiaje carece de la sensibilidad necesaria para detectar una cantidad mínima de células tumorales diseminadas por el flujo sanguíneo que constituyen la enfermedad mínima residual (EMR) (260). La monitorización de CTC y células tumorales diseminadas (CTD) tiene el potencial tanto de mejorar el manejo clínico como de identificar pacientes con elevado riesgo de progresión o recurrencia antes de que existan evidencias clínicas (426). También identificar a priori el potencial metastático de este tipo de tumores. Ahora bien, para emplear esta técnica es necesario disponer de un biomarcador específico de CaP, y *TMPRSS2-ERG* puede asumir este rol. Los genes de fusión son alteraciones formadas de novo en el tumor y que ya han sido usados con éxito en la detección de CTC en otros tipos de cáncer (427).

En primer término, adoptamos un enfoque para la detección de CTCs basado en una cuantificación absoluta por RT-PCR cuantitativa extrapolando los resultados a una curva de concentraciones conocidas de diluciones de la línea celular VCaP portadora de *TMPRSS2-ERG* (300, 428). Para la detección en tiempo real del transcrito del gen de fusión se usó SYBR Green que es un fluoróforo que se intercala en la doble hebra del DNA conforme se va llevando a cabo la reacción de amplificación (429). Tiene la desventaja que se une tanto al amplicón como a productos inespecíficos, así como a dímeros de cebadores, siendo frecuentes, por tanto, los falsos positivos. Todos estos motivos hicieron necesario la puesta a punto de otro método para la cuantificación de CTCs. A tal fin se adoptó un enfoque de cuantificación por plásmidos con sondas y primers específicamente diseñados para nuestras secuencias diana, análogo al descrito por Gabert y cols. para el estudio del gen de fusión *BCR-ABL* en leucemia mieloide crónica (241), incluyendo una sonda que detectara un gen control (*ABL*), después se elabora un ratio entre la expresión del gen diana y la del gen control, normalizando así los resultados a la cantidad de muestra analizada. Esta técnica no es la única usada en la detección de CTCs, también existen otras basadas en ICQ y en menor medida en FISH y CGH. Si bien la RT-PCR es más sensible, también es cierto que tiene elevado riesgo de falsos positivos debidos a contaminación cruzada. Las técnicas basadas en ICQ tienen un paso previo de enriquecimiento por selección de los tipos celulares que vamos a analizar. De hecho el único método de detección de CTCs aprobado por la FDA es CellSearch<sup>®</sup> Veridex que en una primera etapa captura las CTC por captación inmunomagnética con ac antiEpCAM. Este método está aprobado para cáncer de

colon, mama y próstata metastático, tumores con una mayor carga tumoral que los primarios estudiados en este trabajo. De modo que en estos métodos no hay amplificación del material genético como en los métodos basados en qRT-PCR, pero se parte de un material de partida rico en CTCs.

En un trabajo de 1994, Seiden y cols emplean la técnica RT-PCR para detectar transcritos del gen PSA en sangre periférica, detectando estas células tanto en estadios iniciales como metastáticos del CaP (430). Este interesante trabajo tiene varios problemas; por un lado, la expresión del gen PSA no es totalmente específica de CaP. Por otro, la técnica no proporciona resultados cuantitativos, sólo cualitativos. Posteriormente, en 2006, el grupo de Stathopoulou sí que detectó de forma más concluyente CTCs de cáncer de mama mediante qRT-PCR detectando la expresión génica de *CK-19* un componente del citoesqueleto de células epiteliales (285). Nuevamente estos resultados no son comparables a los de nuestro estudio debido a que en este trabajo no se usa un marcador específico del cáncer de mama, si no un marcador de células epiteliales, y por tanto están asumiendo que cualquier célula epitelial en sangre procede del tumor mamario. La misma punción en el momento de la toma de la muestra la puede contaminarla con células de la piel. Por otro lado, al igual que en el presente trabajo, en la detección de la expresión de *CK-19* utilizan sondas específicas.

En este trabajo se ha analizado la presencia del transcrito de *TMPRSS2-ERG* en una serie de 152 piezas de PTR, de las cuales se dispone de SP pre-prostatectomía en 133 casos. En cada uno de ellos se analizó la presencia de *TMPRSS2-ERG* por qRT-PCR. Treinta y tres (23,07%) de estas muestras expresaron el transcrito de *TMPRSS2-ERG*. Centrándonos en estas muestras portadoras de CTC, 13 (39,4%) portaban el gen de fusión en la pieza FFPE; esta diferencia entre el status del gen de fusión en SP y en FFPE puede deberse a la naturaleza multifocal del tumor primario (431, 432), así como a la incapacidad de esta técnica para detectar clones divergentes dentro del tumor primario (433) y a las diferencias de sensibilidad entre las técnicas usadas en la detección de *TMPRSS2-ERG* en SP y en la pieza quirúrgica. En el análisis de la presencia del transcrito del gen de fusión en las muestras obtenidas en el seguimiento clínico, 29 pacientes negativizaron los niveles tanto de CTC como de PSA a partir de la segunda toma, pero P1, en recaída bioquímica, no negativizó PSA pero sí CTC. Mientras que P12, P13 y P26 no negativizaron la expresión de *TMPRSS2-ERG* aunque sí la concentración de PSA. P3 positivizó los niveles de PSA a partir de la segunda toma pero no el nivel de CTC. Es interesante resaltar el hecho de que P2, P3, P7, P8 y P15 positivizaron el nivel de CTC en tomas intermedias del seguimiento sin sufrir una recaída bioquímica. Mención aparte merece el caso de P9 que positivizó CTC en la quinta toma, para posteriormente negativizarlo en la sexta.

Otro de los problemas en el uso clínico de CTCs es el establecimiento de un punto de corte con significación pronóstica o en la monitorización. En un trabajo se asocia la presencia de menos de 5 CTC en 7,5 ml de sangre como indicador de pronóstico favorable en tumores prostáticos resistentes a castración

(434). En otro trabajo la presencia de CTC alcanzó valor pronóstico independiente en un análisis de supervivencia multivariante (243). Debido al bajo número de CTC presentes en los casos incluidos en esta serie se ha optado por tratar la presencia de CTC como una variable cualitativa al no contar con una carga celular circulante suficiente para intentar establecer un punto de corte adecuado.

Mao y col. analizan la presencia de este mismo transcrito de fusión en 27 biopsias de prostatectomías y también en células sanguíneas aisladas de 15 casos de enfermedad avanzada andrógeno-independiente. En las piezas de prostatectomía detectaron el transcrito de fusión en un 44% de los casos, aunque al contrario de nuestra serie, en este trabajo no detectan el transcrito de la fusión por RT-PCR en ninguna de las 15 CTC si bien por FISH sí que encontraron esta lesión génica en 10 de las 15 CTCs (225). La explicación de esta aparente contradicción puede residir en el hecho de que en estadios tardíos del CaP *TMPRSS2-ERG* deja de expresarse si bien la lesión génica permanece en el genoma de la célula cancerosa (191) y por tanto puede detectarse por FISH. Ahora bien la detección de CTC por qRT-PCR tiene mayor sensibilidad que la técnica de FISH. Por otro lado la detección del gen de fusión en muestras con una celularidad tan baja como esta puede ser muy complicada tanto a nivel técnico como analítico. Otro interesante trabajo enmarcado en un ensayo clínico del acetato de abiraterona monitoriza CTC en pacientes resistentes a castración tratados con este fármaco utilizando como biomarcador de respuesta al tratamiento, el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* (297).

El caso paradigmático del uso de CTCs para monitorizar la EMR es la leucemia mieloide crónica, en la que se detectan las células en sangre periférica por la misma naturaleza del tumor (435-437). Caso distinto son los tumores sólidos, dado que las células en sangre están en muy poca cantidad, ya que se descaman del tumor y pasan al sistema circulatorio, siendo en último término responsables de fenómenos de progresión a distancia, metástasis y microémbolos. Por tanto en este tipo de tumores será mucho más sencillo y fiable detectar estas CTCs en el caso de cánceres metastáticos (225, 295), que en la serie analizada en el presente trabajo que consiste en pacientes recién prostatectomizados y sin haber recibido hormonoterapia ni quimioterapia, y por tanto, esta serie está mayoritariamente compuesta por casos órganoconfinados. Recientemente se han publicado estudios que analizan la presencia de *TMPRSS2-ERG* en CTC en CaP avanzado y hormonorresistente como marcador de respuesta a acetato de abiraterona, fármaco que actúa inhibiendo el citocromo P17 (297, 426), así como otro trabajo en el que se analiza la presencia de CTC en estadios más tempranos del CaP (243). A diferencia de los resultados obtenidos en este último trabajo, en esta tesis no se han encontrado relaciones entre la presencia de CTC y factores pronósticos lo que puede deberse al escaso número de eventos de progresión en esta serie.

En definitiva, en esta tesis se pone a punto una técnica basada en qRT-PCR, que se muestra muy útil en la detección de CTCs en CaP no metastático. Es obvio el interés de la detección de este tipo de células en el diagnóstico, pronóstico, seguimiento de la enfermedad y monitorización de fármacos. Los datos de este

trabajo son prometedores aunque la técnica sería mejorable usando un enriquecimiento de CTC mediante anticuerpos específicos. Por su parte, la serie prospectiva de muestras está diseñada de forma que proporcione la máxima cantidad de información. No obstante, dado que no analizamos tumores avanzados o metastáticos hace que requiera una técnica de gran sensibilidad y por otro lado sería interesante disponer de un mayor seguimiento a fin de extraer conclusiones más sólidas principalmente respecto al pronóstico de la enfermedad.



## 6 CONCLUSIONES



A la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- La frecuencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en la población de pacientes con CaP tratados clínicamente con prostatectomía radicales del 47,8%, siendo la variante T1E4 más frecuente (39,8%) que la variante T1E5 (5,4%).

2.- Aunque FISH es el estándar en la detección de genes de fusión, la técnica de RT-PCR presenta una sensibilidad del 81 %, una especificidad del 87 % un Valor Predictivo Positivo del 86 % y un Valor Predictivo Negativo del 82 % lo que hace esta técnica adecuada para la determinación del gen de fusión.

3- La presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* está directamente relacionada con la expresión de *ERG* y *HEPSIN* e inversamente relacionado con la expresión de *ETV1* y *ETV4*.

4- La fusión génica *TMPRSS2-ERG* correlaciona significativamente con la presencia de infiltración perineural.

5- Los parámetros clinicopatológicos de CaP analizados muestran asociaciones con las variables moleculares estudiadas indicando su implicación en la progresión de la enfermedad. Así por ejemplo, cabe destacar que el estadio de Gleason está relacionado con la expresión génica de *PCA3*, *HEPSIN* y *Cav-1*. La concentración sérica de PSA correlaciona con la expresión de los genes *PCA3*, *HEPSIN*, *AMACR* y de las proteínas Cav-1 y TPD52. Y el estadio patológico está relacionado con la expresión de los siguientes genes: *HEPSIN*, *AMACR*, *ERG* y *Cav-1*.

6- La progresión bioquímica se relaciona con la expresión de *ETV4*, *HEPSIN*, *GSTP-1* y *AMACR* y la progresión clínica está estadísticamente relacionada con la expresión génica de *Cav-1*, y de su proteína.

7- El análisis por clústers no supervisados según la expresión de los genes analizados estratifica la serie en 3 grupos que correlacionan con los estadios clínico y patológico y con la presencia de infiltración perineural en la muestra.

## CONCLUSIONES

---

8.- El análisis de supervivencia multivariante respecto al intervalo libre de progresión bioquímica presenta distintos resultados según la composición de casos estudiada. Mientras que para la serie completa tienen valor pronóstico independiente el estadio de Gleason, la concentración sérica de PSA y la presencia de infiltración perineural. Los casos que no portan el gen de fusión tienen como factores de riesgo de recaída la concentración inicial de PSA, el estadio clínico y la presencia de infiltración perineural. Por último, los casos portadores del gen de fusión el estadio de Gleason, la concentración sérica de PSA, la expresión génica de *GSTP-1* y la expresión proteica de TPD-52 tienen valor pronóstico.

9.- La combinación de los parámetros Gleason y los niveles de expresión de *GSTP-1* definen 5 grupos de pacientes con un comportamiento biológico claramente diferenciado en cuanto al intervalo libre de progresión bioquímica. Esta combinación de parámetros podría ser útil en contextos clínicos como la vigilancia activa.

10.- Se ha establecido un método sensible para medir células tumorales prostáticas circulantes en sangre periférica mediante cuantificación absoluta por PCR cuantitativa, siendo la incidencia del gen de fusión en sangre periférica del 24,8%.

11.- La presencia del gen de fusión en sangre periférica no correlaciona con ninguno de los parámetros clínicopatológicos estudiados, si bien el tiempo de seguimiento de esta serie es todavía corto como para extraer conclusiones definitivas.

## 7 BIBLIOGRAFÍA



1. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006;11:1388-413.
2. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Gómez BP, Barrera VH, Lope V, et al. Situación del cáncer en España: incidencia State of cancer in Spain: incidence. *An Sist Sanit Navar.* 2004;27(2):165-73.
3. Granado de la Orden S, Saa Requejo C, Quintas Viqueira A. [Epidemiological situation of prostate cancer in Spain]. *Actas Urol Esp.* 2006 Jun;30(6):574-82.
4. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. Blackwell Science, Ltd; 2002. p. 162-73.
5. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. *Gray Anatomia para estudiantes.* Primera ed.; 2007.
6. Feneis H, Dauber W. *Pocket atlas of human anatomy: based on the international nomenclature.* Georg Thieme Verlag; 2000.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Prometheus: Texto y atlas de anatomía.* Panamericana; 2006.
8. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):256-69.
9. Ostrander EA, Johannesson B. Prostate cancer susceptibility loci: finding the genes. *Adv Exp Med Biol.* 2008;617:179-90.
10. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jul 24;349(4):366-81.
11. Taichman RS, Loberg RD, Mehra R, Pienta KJ. The evolving biology and treatment of prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 2007;117(9):2351-61.
12. Smith RA, Cokkinides V, von Eschenbach AC, Levin B, Cohen C, Runowicz CD, et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2002;52(1):8-22.

## BIBLIOGRAFÍA

---

13. Borque A, Sanz G, Allepuz C, Plaza L, Gil P, Rioja LA. The use of neural networks and logistic regression analysis for predicting pathological stage in men undergoing radical prostatectomy: a population based study. *The Journal of urology*. 2001;166(5):1672.
14. Ramírez-Backhaus M, Bahilo P, Arlandis S, Santamaría Navarro C, Pontones Moreno JL, Jiménez-Cruz F. Prospective validation of a nomogram predictive of a positive initial prostate biopsy. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. 2010;34(1):35-42.
15. Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med*. 2001 May 3;344(18):1373-7.
16. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383-91.
17. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(22):2239-46.
18. Moul JW, Sun L, Hotaling JM, Fitzsimons NJ, Polascik TJ, Robertson CN, et al. Age adjusted prostate specific antigen and prostate specific antigen velocity cut points in prostate cancer screening. *The Journal of urology*. 2007;177(2):499-504.
19. Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH. The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol*. 1992 Mar;147(3 Pt 2):817-21.
20. Seaman E, Whang M, Olsson CA, Katz A, Cooner WH, Benson MC. PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management. *Urol Clin North Am*. 1993 Nov;20(4):653-63.
21. Brawer MK, Aramburu EA, Chen GL, Preston SD, Ellis WJ. The inability of prostate specific antigen index to enhance the predictive the value of prostate specific antigen in the diagnosis of prostatic carcinoma. *J Urol*. 1993 Aug;150(2 Pt 1):369-73.
22. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and

- serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 1994 May;151(5):1283-90.
23. Djavan B, Remzi M, Schulman CC, Marberger M, Zlotta AR. Repeat prostate biopsy: who, how and when?. a review. *Eur Urol*. 2002 Aug;42(2):93-103.
  24. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, et al. Longitudinal evaluation of serum androgen levels in men with and without prostate cancer. *Prostate*. 1995 Jul;27(1):25-31.
  25. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am*. 1997 May;24(2):333-8.
  26. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem*. 1990 Dec 27;194(3):755-63.
  27. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res*. 1991 Jan 1;51(1):222-6.
  28. McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology*. 1995 May;45(5):729-44.
  29. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*. 2002 Feb;167(2 Pt 1):528-34.
  30. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. *Int Braz J Urol*. 2009 Sep-Oct;35(5):521-9; discussion 30-2.
  31. Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, et al. Mortality results from the Goteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):725-32.

## BIBLIOGRAFÍA

---

32. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26;360(13):1320-8.
33. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26;360(13):1310-9.
34. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292-306.
35. Godoy MPS. Examen digital rectal, antígeno prostático específico y ultrasonografía transrectal de próstata para el diagnóstico temprano de cáncer de próstata; Digital rectal examination, prostate specific antigen and prostatic transrectal sonography for the early diagnosis of prostatic cancer. *Diagnóstico (Perú)*. 1999;38(2):68-77.
36. Herranz Amo F, Verdu Tartajo F, Martinez Salamanca JI. [Prostate cancer and transrectal ultrasound]. *Arch Esp Urol*. 2006 May;59(4):361-75.
37. Guichard G, Larré S, Gallina A, Lazar A, Faucon H, Chemama S, et al. Extended 21-sample needle biopsy protocol for diagnosis of prostate cancer in 1000 consecutive patients. *European urology*. 2007;52(2):430-5.
38. Heidenreich A, Ausb G, Bollac M, Joniaud S, Matveeve VB, Schmid HP, et al. Guía de la EAU para el Cáncer de Próstata. *Actas Urológicas Españolas*. 2009;33(2):113-26.
39. Donovan J, Hamdy F, Neal D, Peters T, Oliver S, Brindle L, et al. Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT) feasibility study. *Health Technol Assess*. 2003;7(14):1-88.
40. Evans AJ, Henry PC, Van der Kwast TH, Tkachuk DC, Watson K, Lockwood GA, et al. Interobserver variability between expert urologic pathologists for extraprostatic extension and surgical margin status in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol*. 2008 Oct;32(10):1503-12.
41. Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for

- high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2007 May;8(5):411-9.
42. Osorio Pazo F, Mouro Giudice L, Jubin Martinez J. [Prognostic value in radical prostatectomy of positive cylinders number and cancer percentage per cylinder in prostate biopsy]. *Actas Urol Esp.* 2003 Jul-Aug;27(7):538-42.
  43. Msaouel P, Pissimissis N, Halapas A, Koutsilieris M. Mechanisms of bone metastasis in prostate cancer: clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Apr;22(2):341-55.
  44. Chodak GW, Thisted RA, Gerber GS, Johansson JE, Adolfsson J, Jones GW, et al. Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 1994 Jan 27;330(4):242-8.
  45. Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 1998 Sep 16;280(11):975-80.
  46. Heidenreich A, Ohlmann CH, Polyakov S. Anatomical extent of pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy. *European urology.* 2007;52(1):29-37.
  47. Kumar S, Shelley M, Harrison C, Coles B, Wilt TJ, Mason MD. Neoadjuvant and adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD006019.
  48. Messing EM, Manola J, Yao J, Kiernan M, Crawford D, Wilding G, et al. Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol.* 2006;7(6):472-9.
  49. McLeod DG, Iversen P, See WA, Morris T, Armstrong JON, Wirth MP. Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU international.* 2006;97(2):247-54.
  50. Donoso V. El tratamiento del cáncer de próstata: Presente y futuro, realidades y posibilidades. *Actas Urol Esp.* 2007;31(6):575-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

51. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, et al. [EAU guidelines on prostate cancer]. *Actas Urol Esp.* 2009 Feb;33(2):113-26.
52. Aus G. Current status of HIFU and cryotherapy in prostate cancer-a review. *European urology.* 2006;50(5):927-34.
53. 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. *Ann Intern Med.* 2000 Apr 4;132(7):566-77.
54. Samson DJ, Seidenfeld J, Schmitt B, Hasselblad V, Albertsen PC, Bennett CL, et al. Systematic review and meta analysis of monotherapy compared with combined androgen blockade for patients with advanced prostate carcinoma. *Cancer.* 2002;95(2):361-76.
55. Scher HI, Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol.* 2005 Nov 10;23(32):8253-61.
56. Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, CarMichel M, Cisek L, Johnson DE, et al. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* 1995 May;1(5):473-80.
57. Brothman AR, Maxwell TM, Cui J, Deubler DA, Zhu XL. Chromosomal clues to the development of prostate tumors. *Prostate.* 1999 Mar 1;38(4):303-12.
58. Micale MA, Sanford JS, Powell IJ, Sakr WA, Wolman SR. Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: paraffin FISH vs. metaphase analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993 Aug;69(1):7-12.
59. Brothman AR. Cytogenetics and molecular genetics of cancer of the prostate. *Am J Med Genet.* 2002 Oct 30;115(3):150-6.
60. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol.* 1998 Jul;153(1):141-8.

61. Nagai Y, Kojima T, Muro Y, Hachiya T, Nishizawa Y, Wakabayashi T, et al. Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. *FEBS Lett.* 1997 Nov 24;418(1-2):23-6.
62. Hernandez-Munoz I, Lund AH, van der Stoop P, Boutsma E, Muijers I, Verhoeven E, et al. Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 24;102(21):7635-40.
63. Lei Q, Jiao J, Xin L, Chang CJ, Wang S, Gao J, et al. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell.* 2006 May;9(5):367-78.
64. Vecchione A, Gottardo F, Gomella LG, Wildemore B, Fassan M, Bragantini E, et al. Molecular genetics of prostate cancer: clinical translational opportunities. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007 Mar;26(1):25-37.
65. Cooney KA, McCarthy JD, Lange E, Huang L, Miesfeldt S, Montie JE, et al. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jul 2;89(13):955-9.
66. Leite KR, Franco MF, Srougi M, Nesrallah LJ, Nesrallah A, Bevilacqua RG, et al. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):428-36.
67. Guo Z, Johansson SL, Rhim JS, Vishwanatha JK. Fragile histidine triad gene expression in primary prostate cancer and in an in vitro model. *Prostate.* 2000 May 1;43(2):101-10.
68. Chaib H, MacDonald JW, Vessella RL, Washburn JG, Quinn JE, Odman A, et al. Haploinsufficiency and reduced expression of genes localized to the 8p chromosomal region in human prostate tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Jul;37(3):306-13.
69. True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, et al. A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 18;103(29):10991-6.
70. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by

## BIBLIOGRAFÍA

---

- complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Oct 20;91(20):1758-64.
71. Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 Jun 15;42(6):363-9.
72. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1687-97.
73. Rubenstein M, Slobodskoy L, Mirochnik Y, Guinan P. Backbone modification alters the efficacy of antisense oligonucleotides directed against mRNA encoding either TGF- $\alpha$  or EGFR in the treatment of prostate cancer cell lines. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002 Dec;24(10):649-52.
74. Figueroa JA, De Raad S, Tadlock L, Speights VO, Rinehart JJ. Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins in high versus low Gleason score prostate cancer. *J Urol.* 1998 Apr;159(4):1379-83.
75. Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 1999 Oct 1;41(2):127-33.
76. Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, et al. Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2000 Sep 1;157(2):169-76.
77. Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep.* 2004 Sep;12(3):631-7.
78. Poletti F, Medici MC, Alinovi A, Menozzi MG, Sacchini P, Stagni G, et al. Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the prostatic cells in patients affected by nonacute abacterial prostatitis. *J Urol.* 1985 Oct;134(4):691-3.
79. Gardner WA, Jr., Culberson DE, Bennett BD. *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med.* 1986 May;110(5):430-2.

80. Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo AM, Leitzmann MF, Willett WC, Platz EA. Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2160-6.
81. Cohen RJ, Shannon BA, McNeal JE, Shannon T, Garrett KL. Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution? *J Urol.* 2005 Jun;173(6):1969-74.
82. Elkahwaji JE, Hauke RJ, Brawner CM. Chronic bacterial inflammation induces prostatic intraepithelial neoplasia in mouse prostate. *Br J Cancer.* 2009 Nov 17;101(10):1740-8.
83. Strickler HD, Goedert JJ. Sexual behavior and evidence for an infectious cause of prostate cancer. *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):144-51.
84. Mahmud S, Franco E, Aprikian A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2004 Jan 12;90(1):93-9.
85. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *The Journal of urology.* 1993;150(3):797-802.
86. Bratt O, Kristoffersson U, Lundgren R, Olsson H. Familial and hereditary prostate cancer in southern Sweden. A population-based case-control study. *European Journal of Cancer.* 1999;35(2):272-7.
87. Keetch DW, Humphrey PA, Smith DS, Stahl D, Catalona WJ. Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. *The Journal of urology.* 1996;155(6):1841-3.
88. Hsieh CL, Oakley-Girvan I, Gallagher RP, Wu AH, Kolonel LN, Teh CZ, et al. Re: prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Dec 17;89(24):1893-4.
89. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1371-4.

## BIBLIOGRAFÍA

---

90. Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, et al. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature Genetics*. 1998;20(2):175-9.
91. Cannon-Albright LA, Thomas A, Goldgar DE, Gholami K, Rowe K, Jacobsen M, et al. Familiality of cancer in Utah. *Cancer Res*. 1994 May 1;54(9):2378-85.
92. Cerhan JR, Parker AS, Putnam SD, Chiu BC, Lynch CF, Cohen MB, et al. Family history and prostate cancer risk in a population-based cohort of Iowa men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Jan;8(1):53-60.
93. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Nov 2;86(21):1600-8.
94. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*. 1994;343(8899):692-5.
95. Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, et al. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet*. 1997 Jul;61(1):120-8.
96. Thorlacius S, Struewing JP, Hartage P, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, et al. Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *The Lancet*. 1998;352(9137):1337-9.
97. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R, et al. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int*. 2009 Dec;104(11):1560-72.
98. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):652-8.
99. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 19;103(38):14068-73.

100. Lin DW, FitzGerald LM, Fu R, Kwon EM, Zheng SL, Kolb S, et al. Genetic variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF genes are prognostic markers of prostate cancer-specific mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Sep;20(9):1928-36.
101. Borque A, Del Amo J, Esteban LM, Ars E, Hernandez C, Planas J, et al. Genetic predisposition to early recurrence in clinically localized prostate cancer. *BJU Int.* 2012 Jul 3.
102. Morote J, Del Amo J, Borque A, Ars E, Hernandez C, Herranz F, et al. Improved prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy by genetic polymorphisms. *J Urol.* 2010 Aug;184(2):506-11.
103. McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet.* 2008 Oct;40(10):1166-74.
104. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010;61:437-55.
105. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451-81.
106. Diskin SJ, Hou C, Glessner JT, Attiyeh EF, Laudenslager M, Bosse K, et al. Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature.* 2009 Jun 18;459(7249):987-91.
107. Shlien A, Tabori U, Marshall CR, Pienkowska M, Feuk L, Novokmet A, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 12;105(32):11264-9.
108. Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Pelzer A, Bektic J, Oberaigner W, et al. Tyrol Prostate Cancer Demonstration Project: early detection, treatment, outcome, incidence and mortality. *BJU Int.* 2008 Apr;101(7):809-16.
109. Bernardini S, Miano R, Iori R, Finazzi-Agro E, Palmieri G, Ballerini S, et al. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? *Clin Chim Acta.* 2004 Dec;350(1-2):181-8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

110. Diamandis EP. POINT: EPCA-2: a promising new serum biomarker for prostatic carcinoma? *Clin Biochem.* 2007 Dec;40(18):1437-9.
111. Dhir R, Vietmeier B, Arlotti J, Acquafondata M, Landsittel D, Masterson R, et al. Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *J Urol.* 2004 Apr;171(4):1419-23.
112. Uetsuki H, Tsunemori H, Taoka R, Haba R, Ishikawa M, Kakehi Y. Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. *J Urol.* 2005 Aug;174(2):514-8.
113. Gonzalgo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology.* 2004 Feb;63(2):414-8.
114. Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *Annu Rev Med.* 2008 Oct 23.
115. Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2727-30.
116. Wright JL, Lange PH. Newer potential biomarkers in prostate cancer. *Rev Urol.* 2007 Fall;9(4):207-13.
117. Lloyd MD, Darley DJ, Wierzbicki AS, Threadgill MD. Alpha-methylacyl-CoA racemase--an 'obscure' metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J.* 2008 Mar;275(6):1089-102.
118. Mobley JA, Leav I, Zielie P, Wotkowitz C, Evans J, Lam YW, et al. Branched fatty acids in dairy and beef products markedly enhance alpha-methylacyl-CoA racemase expression in prostate cancer cells in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Aug;12(8):775-83.
119. Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, et al. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1501-3.
120. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, Hayes DC, Ostenson R, Goodman G, et al. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. *Mol Diagn Ther.* 2006;10(6):397-403.

121. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *J Urol*. 2004 Sep;172(3):1130-3.
122. Wilson S, Greer B, Hooper J, Zijlstra A, Walker B, Quigley J, et al. The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J*. 2005 Jun 15;388(Pt 3):967-72.
123. Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, et al. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*. 2007 May 15;67(7):743-56.
124. Klezovitch O, Chevillet J, Mirosevich J, Roberts RL, Matusik RJ, Vasioukhin V. Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):185-95.
125. Magee JA, Araki T, Patil S, Ehrig T, True L, Humphrey PA, et al. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001 Aug 1;61(15):5692-6.
126. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001 Aug 23;412(6849):822-6.
127. Bachmann M, Möröy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(4):726-30.
128. Valdman A, Fang X, Pang ST, Ekman P, Egevad L. Pim-1 expression in prostatic intraepithelial neoplasia and human prostate cancer. *The Prostate*. 2004;60(4):367-71.
129. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, et al. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur urol*. 2009;56(2):275-86.
130. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1400-6.

## BIBLIOGRAFÍA

---

131. Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, Stenman UH, Tammela TL, Saramaki OR, et al. Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 May 15;16(10):2845-51.
132. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):645-9.
133. Ateeq B, Tomlins SA, Laxman B, Asangani IA, Cao Q, Cao X, et al. Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 2;3(72):72ra17.
134. Balleine RL, Fejzo MS, Sathasivam P, Basset P, Clarke CL, Byrne JA. The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2000;29(1):48-57.
135. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12963-8.
136. Byrne JA, Balleine RL, Fejzo MS, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, et al. Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. *International journal of cancer.* 2005;117(6):1049-54.
137. Schaner ME, Davidson B, Skrede M, Reich R, Florenes VA, Risberg B, et al. Variation in gene expression patterns in effusions and primary tumors from serous ovarian cancer patients. *Mol Cancer.* 2005;4:26.
138. Petrova DT, Asif AR, Armstrong VW, Dimova I, Toshev S, Yaramov N, et al. Expression of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) and tumor protein D52 (TPD52) as potential biomarkers for colorectal cancer. *Clinical biochemistry.* 2008;41(14-15):1224-36.
139. Cher ML, Macgrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB, Jensen RH. Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 1994;11(3):153-62.

140. Macoska JA, Trybus TM, Sakr WA, Wolf MC, Benson PD, Powell IJ, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1994 Jul 15;54(14):3824-30.
141. Porkka K, Saramäki O, Tanner M, Visakorpi T. Amplification and overexpression of Elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. *Laboratory investigation.* 2002;82(5):629-38.
142. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1997 Feb 1;57(3):524-31.
143. Reiter RE, Sato I, Thomas G, Qian J, Gu Z, Watabe T, et al. Coamplification of prostate stem cell antigen (PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2000;27(1):95-103.
144. DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, et al. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol.* 2002;3(7):2002-3.
145. Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, et al. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11890-5.
146. Rubin MA, Varambally S, Beroukhir R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, et al. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer research.* 2004;64(11):3814.
147. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
148. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
149. Shen MM, Abate-Shen C. Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jul 15;67(14):6535-8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

150. Huang H, Cheville JC, Pan Y, Roche PC, Schmidt LJ, Tindall DJ. PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38830-6.
151. Priulla M, Calastretti A, Bruno P, Amalia A, Paradiso A, Canti G, et al. Preferential chemosensitization of PTEN mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *The Prostate*. 2007;67(7):782-9.
152. Anai S, Goodison S, Shiverick K, Iczkowski K, Tanaka M, Rosser CJ. Combination of PTEN gene therapy and radiation inhibits the growth of human prostate cancer xenografts. *Human gene therapy*. 2006;17(10):975-84.
153. Pourmand G, Ziaee AA, Abedi AR, Mehraei A, Alavi HA, Ahmadi A, et al. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J*. 2007 Spring;4(2):95-100.
154. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res*. 1999 Sep 1;59(17):4291-6.
155. Uzoh CC, Perks CM, Bahl A, Holly JMP, Sugiono M, Persad RA. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. *BJU international*. 2009;104(4):556-61.
156. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*. 2007 Jun;80(2):51-60.
157. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007 Jul;28(7):1379-86.
158. Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Jun;7(2):115-29.
159. Wu Z, McRoberts KS, Theodorescu D. The role of PTEN in prostate cancer cell tropism to the bone micro-environment. *Carcinogenesis*. 2007 Jul;28(7):1393-400.
160. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000;100(4):387-90.

161. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in L-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem.* 2006 May 12;281(19):13694-707.
162. Li L, Ittmann MM, Ayala G, Tsai MJ, Amato RJ, Wheeler TM, et al. The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate cancer and prostatic diseases.* 2005;8(2):108-18.
163. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol.* 2009 Aug;22(8):1083-93.
164. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999 Dec 1;59(23):5975-9.
165. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2695-8.
166. Hessels D, Klein Gunnewiek JMT, van Oort I, Karthaus HFM, van Leenders GJL, van Balken B, et al. DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European urology.* 2003;44(1):8-16.
167. Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, Roper K, Teng L, Fang ZM, et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One.* 2009;4(3):e4995.
168. Salagierski M, Verhaegh GW, Jannink SA, Smit FP, Hessels D, Schalken JA. Differential expression of PCA3 and its overlapping PRUNE2 transcript in prostate cancer. *The Prostate.* 2010;70(1):70-8.
169. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology.* 2003;62(5):34-43.

## BIBLIOGRAFÍA

---

170. Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H. PCA3: From basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Letters*. 2011;301(1):1-6.
171. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology*. 2004;64(2):311-5.
172. Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CY. The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Mar;11(3):305-9.
173. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine-a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur urol*. 2004;46(2):182-7.
174. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2006 Jun;52(6):1089-95.
175. Deras IL, Aubin SMJ, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *The Journal of urology*. 2008;179(4):1587-92.
176. Haese A, de la Taille A, Van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol*. 2008;54(5):1081-8.
177. Schilling D, Hennenlotter J, Munz M, Bokeler U, Sievert KD, Stenzl A. Interpretation of the prostate cancer gene 3 in reference to the individual clinical background: implications for daily practice. *Urol Int*. 2010;85(2):159-65.
178. Marks LS, Fradet Y, Lim Deras I, Blase A, Mathis J, Aubin SMJ, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology*. 2007;69(3):532-5.
179. Chun FK, de la Taille A, Van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PFA, et al. Prostate cancer gene 3 (PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *European urology*. 2009;56(4):659-68.

180. Rubio-Briones J, Fernandez-Serra A, Ramirez M, Rubio L, Collado A, Casanova J, et al. Outcomes of Expanded Use of PCA3 Testing in a Spanish Population with Clinical Suspicion of Prostate Cancer. *Actas Urol Esp*. 2011 Jun 21.
181. Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, Bhadkamkar V, Blase A, Kumar SV, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol*. 2008 May;179(5):1804-9; discussion 9-10.
182. Frohling S, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Aug 14;359(7):722-34.
183. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jul;8(7):497-511.
184. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest*. 2001 Jun;81(6):803-14.
185. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8.
186. Ghosh D, Chinnaiyan AM. Genomic outlier profile analysis: mixture models, null hypotheses, and nonparametric estimation. *Biostatistics*. 2009 Jan;10(1):60-9.
187. Rubin MA, Chinnaiyan AM. Bioinformatics approach leads to the discovery of the TMPRSS2: ETS gene fusion in prostate cancer. *Laboratory Investigation*. 2006;86(11):1099-102.
188. Thompson AD, Teitell MA, Arvand A, Denny CT. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene*. 1999 Sep 30;18(40):5506-13.
189. Lucas JM, True L, Hawley S, Matsumura M, Morrissey C, Vessella R, et al. The androgen-regulated type II serine protease TMPRSS2 is differentially expressed and mislocalized in prostate adenocarcinoma. *J Pathol*. 2008 Jun;215(2):118-25.

## BIBLIOGRAFÍA

---

190. Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, Nelson PS. Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):965-75.
191. Hermans KG, van Marion R, van Dekken H, Jenster G, van Weerden WM, Trapman J. TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):10658-63.
192. Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer science.* 2004;95(8):626-33.
193. Turner AM, Morris KV. Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. *Biotechniques.* 2010 Jun;48(6):ix-xvi.
194. Hermans KG, Bressers AA, van der Korput HA, Dits NF, Jenster G, Trapman J. Two unique novel prostate-specific and androgen-regulated fusion partners of ETV4 in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3094-8.
195. Murakami K, Mavrothalassitis G, Bhat NK, Fisher RJ, Papas TS. Human ERG-2 protein is a phosphorylated DNA-binding protein--a distinct member of the ets family. *Oncogene.* 1993 Jun;8(6):1559-66.
196. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furusato B, Sun C, Chen Y, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene.* 2005 May 26;24(23):3847-52.
197. Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 1;14(11):3395-400.
198. Fernandez-Serra A, Rubio-Briones J, Garcia-Casado Z, Solsona E, Lopez-Guerrero JA. [Prostate cancer: the revolution of the fusion genes]. *Actas Urol Esp.* 2011 Jul-Aug;35(7):420-8.
199. Yoshimoto M, Cutz JC, Nuin PA, Joshua AM, Bayani J, Evans AJ, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Sep;169(2):128-37.

200. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3396-400.
201. Helgeson B, Tomlins S, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner J, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(1):73-80.
202. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature.* 2007 Aug 2;448(7153):595-9.
203. Maher CA, Palanisamy N, Brenner JC, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Luo S, et al. Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 28;106(30):12353-8.
204. Pflueger D, Rickman DS, Sboner A, Perner S, LaFargue CJ, Svensson MA, et al. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia.* 2009 Aug;11(8):804-11.
205. Joshua AM, Evans A, Van der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, et al. Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2008;1785(2):156-81.
206. Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, et al. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 9;105(49):19199-204.
207. Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science.* 2009 Nov 27;326(5957):1230.
208. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* 2008 Feb;10(2):177-88.
209. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 1995 Nov 15;55(22):5195-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

210. 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):e10547.
211. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):619-24.
212. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Ludkovski O, et al. Absence of TMPRSS2: ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod pathol*. 2008;21(12):1451-60.
213. Zong Y, Xin L, Goldstein AS, Lawson DA, Teitell MA, Witte ON. ETS family transcription factors collaborate with alternative signaling pathways to induce carcinoma from adult murine prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 28;106(30):12465-70.
214. Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10242-6.
215. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nature genetics*. 2009;41(5):524-6.
216. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2912-8.
217. Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, Calatrava A, García-Casado Z, Rubio L, Bonillo MA, et al. Clinical Implications of TMPRSS2-ERG Gene Fusion Expression in Patients With Prostate Cancer Treated With Radical Prostatectomy. *The Journal of Urology*. 2010;183(5):2054-61.
218. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8347-51.

219. Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*. 2006;26(18):2667-73.
220. Hermans KG, Boormans JL, Gasi D, van Leenders GJ, Jenster G, Verhagen PC, et al. Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6398-403.
221. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, Costa V, Henrique R, Jeronimo C, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*. 2006 Oct;8(10):826-32.
222. Mehra R, Han B, Tomlins SA, Wang L, Menon A, Wasco MJ, et al. Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):7991-5.
223. Hofer MD, Kuefer R, Maier C, Herkommer K, Perner S, Demichelis F, et al. Genome-wide linkage analysis of TMPRSS2-ERG fusion in familial prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Jan 15;69(2):640-6.
224. Jost M, Day JR, Slaughter R, Koreckij TD, Gonzales D, Kinnunen M, et al. Molecular assays for the detection of prostate tumor derived nucleic acids in peripheral blood. *Mol Cancer*. 2010;9:174.
225. Mao X, Shaw G, James SY, Purkis P, Kudahetti SC, Tsigani T, et al. Detection of TMPRSS2: ERG fusion gene in circulating prostate cancer cells. *Asian Journal of Andrology*. 2008;10(3):467-73.
226. Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, et al. Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia*. 2006 Oct;8(10):885-8.
227. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol*. 2011 May 19.

## BIBLIOGRAFÍA

---

228. Setlur SR, Mertz KD, Hoshida Y, Demichelis F, Lupien M, Perner S, et al. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jun 4;100(11):815-25.
229. Cheville JC, Karnes RJ, Therneau TM, Kosari F, Munz JM, Tillmans L, et al. Gene panel model predictive of outcome in men at high-risk of systemic progression and death from prostate cancer after radical retropubic prostatectomy. *Journal of Clinical Oncology.* 2008;26(24):3930.
230. Dai MJ, Chen LL, Zheng YB, Chen W, Tao ZH, Weng ZL, et al. Frequency and transcript variant analysis of gene fusions between TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Zhonghua yi xue za zhi.* 2008;88(10):669.
231. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, et al. TMPRSS2: ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene.* 2007;26(31):4596-9.
232. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, Li C, Kaygusuz G, van de Rijn M, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Modern pathology.* 2007;20(4):467-73.
233. Nam RK, Sugar L, Wang Z, Yang W, Kitching R, Klotz LH, et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 2007 Jan;6(1):40-5.
234. Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. Expression of the TMPRSS2: ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *British journal of cancer.* 2007;97(12):1690-5.
235. Rouzier C, Haudebourg J, Carpentier X, Valério L, Amiel J, Michiels JF, et al. Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2008;183(1):21-7.

236. Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2007 May;17(5):1033-6.
237. Mao X, Yu Y, Boyd LK, Ren G, Lin D, Chaplin T, et al. Distinct genomic alterations in prostate cancers in Chinese and Western populations suggest alternative pathways of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5207-12.
238. Darnell JE, Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):740-9.
239. Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D, Wright RD, et al. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS Med.* 2007 Apr;4(4):e122.
240. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology.* 2012 Jan;60(1):187-98.
241. Gabert J, Beillard E, Van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Nature Publishing Group;* 2003. p. 2318-57.
242. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res.* 2003;162:149-55.
243. Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Loudyi A, Fink LM, Ward DC, Vogelzang NJ. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2011 Sep;9(1):31-8.
244. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med.* 2006 Mar;12(3):130-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

245. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007 Aug 18;253(2):180-204.
246. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998 Jul 30;394(6692):485-90.
247. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
248. Flintoft L. Going for the double. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(3):172-.
249. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2005 Nov 15;11(22):8006-14.
250. Lafrenie R, Shaughnessy SG, Orr FW. Cancer cell interactions with injured or activated endothelium. *Cancer Metastasis Rev.* 1992 Nov;11(3-4):377-88.
251. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8319-26.
252. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):261-73.
253. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 1869;14(3):146-9.
254. Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist.* 2009 Nov;14(11):1070-82.
255. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact

- with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14608-13.
256. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *AACR*; 2005. p. 2378-86.
257. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. *ASIP*; 1998. p. 865-73.
258. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2009 Aug;35(5):463-74.
259. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):57-63.
260. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005 Nov;68(1):25-30.
261. Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*. 1998 Mar;26(3):252-64.
262. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Springer*; 2000. p. 785-92.
263. Naume B, Borgen E, Tossvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy*. 2004;6(3):244-52.
264. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major

## BIBLIOGRAFÍA

---

- carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 15;10(20):6897-904.
265. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med.* 2008 Jul 24;359(4):366-77.
266. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.
267. Sequist LV, Nagrath S, Toner M, Haber DA, Lynch TJ. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2009 Mar;4(3):281-3.
268. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Informa Healthcare;* 2005. p. 171-85.
269. Zach O, Lutz D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):48-56.
270. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer.* 2005 Mar 14;92(5):906-12.
271. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol.* 2000 Apr;18(7):1432-9.
272. Naoe M, Ogawa Y, Morita J, Omori K, Takeshita K, Shichijyo T, et al. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer.* 2007 Apr 1;109(7):1439-45.
273. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4589-94.
274. Goodman OB, Jr., Fink LM, Symanowski JT, Wong B, Grobaski B, Pomerantz D, et al. Circulating tumor cells in patients with castration-

- resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jun;18(6):1904-13.
275. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* May;64(5):415-20.
276. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, Butler RN, Mi JX, Sage RE, et al. Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1993 Aug 1;53(15):3455-8.
277. Loberg RD, Fridman Y, Pienta BA, Keller ET, McCauley LK, Taichman RS, et al. Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review. *Neoplasia.* 2004 Jul-Aug;6(4):302-9.
278. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 1;13(3):920-8.
279. Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, et al. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron.* 2006 Apr 15;21(10):1893-9.
280. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul;8(7):2073-84.
281. Hauch S, Zimmermann S, Lankiewicz S, Zieglschmid V, BÖcher O, Albert WH. The clinical significance of circulating tumour cells in breast cancer and colorectal cancer patients. *Anticancer research.* 2007;27(3A):1337.
282. Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Review: polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 1999 Dec;8(4):165-75.

## BIBLIOGRAFÍA

---

283. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91.
284. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, et al. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer science*. 2003;94(10):851-7.
285. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer*. 2006 Oct 1;119(7):1654-9.
286. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.
287. Garrigós N, Gallego J, Guillén-Ponce C, Guaraz P, García-Bautista M, Castillejo A, et al. Circulating tumour cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study. *Clinical and Translational Oncology*. 2010;12(2):142-7.
288. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2006 Jul;6(2):125-32.
289. de Alava E, Lozano MD, Patiño A, Sierrasesúmaga L, Pardo-Mindán FJ. Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagnostic Molecular Pathology*. 1998;7(3):152-7.
290. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 1;13(23):7053-8.
291. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment

- in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(19):6302.
292. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, et al. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol*. 1995 May;13(5):1195-200.
293. Moreno JG, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*. 2005 Apr;65(4):713-8.
294. Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, Ledaki I, Attard G, Carden CP, et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol*. 2009 Jan;20(1):27-33.
295. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2023-9.
296. Davis JW, Nakanishi H, Kumar VS, Bhadkamkar VA, McCormack R, Fritsche HA, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol*. 2008 Jun;179(6):2187-91; discussion 91.
297. Danila DC, Anand A, Sung CC, Heller G, Leversha MA, Cao L, et al. TMPRSS2-ERG status in circulating tumor cells as a predictive biomarker of sensitivity in castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. *Eur Urol*. 2011 Nov;60(5):897-904.
298. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979 Nov 27;18(24):5294-9.
299. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb;76(2):615-9.
300. Korenchuk S, Lehr JE, L MC, Lee YG, Whitney S, Vessella R, et al. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo*. 2001 Mar-Apr;15(2):163-8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

301. Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):419-29.
302. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
303. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000 Oct 15;285(2):194-204.
304. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9.
305. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988 Nov 25;16(22):10881-90.
306. Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. Nature Publishing Group; 2003. p. 1013-34.
307. Tu JJ, Rohan S, Kao J, Kitabayashi N, Mathew S, Chen YT. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol.* 2007 Sep;20(9):921-8.
308. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2474-86.
309. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine.* 1998;4(7):844-7.

310. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HRH. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Current Medical Research and Opinion®*. 2004;20(5):707-12.
311. Attard G, Clark J, Ambroisine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Jan 10;27(3):253-63.
312. Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8337-41.
313. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association*. 1958;53(282):457-81.
314. Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *Journal of the Royal Statistical Society Series A (General)*. 1972;135:185-207.
315. Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1972;34:187-220.
316. Thomson AH, Kulkarni S, Bahl A. Primary cryotherapy with salvage external beam radiotherapy for locally recurrent prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008 Jun;20(5):385.
317. Rabbani F, Stroumbakis N, Kava BR, Cookson MS, Fair WR. Incidence and clinical significance of false-negative sextant prostate biopsies. *J Urol*. 1998 Apr;159(4):1247-50.
318. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, Scherer B, Zincke H. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol*. 2001 Jan;165(1):119-25.
319. Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med*. 2011 Aug 3;3(94):94ra72.

## BIBLIOGRAFÍA

---

320. Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5103-8.
321. Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, Soller W, Lundgren R, Panagopoulos I. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Jul;45(7):717-9.
322. Yoshimoto M, Joshua AM, Chilton-Macneill S, Bayani J, Selvarajah S, Evans AJ, et al. Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement. *Neoplasia.* 2006 Jun;8(6):465-9.
323. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, Nadeem O, Wang L, Wei JT, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol.* 2007 May;20(5):538-44.
324. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, Cao X, Wang L, Menon A, et al. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 May 15;68(10):3584-90.
325. Mosquera JM, Perner S, Demichelis F, Kim R, Hofer MD, Mertz KD, et al. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer No conflicts of interest were declared. *The Journal of Pathology.* 2007;212(1):91-101.
326. Rajput AB, Miller MA, De Luca A, Boyd N, Leung S, Hurtado-Coll A, et al. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol.* 2007 Nov;60(11):1238-43.
327. Braun M, Scheble VJ, Menon R, Scharf G, Wilbertz T, Petersen K, et al. Relevance of cohort design for studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer. *Histopathology.* 2011 Jun;58(7):1028-36.

328. 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. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jun;31(6):882-8.
329. Attard G, Clark J, Ambroisine L, Mills IG, Fisher G, Flohr P, et al. Heterogeneity and clinical significance of ETV1 translocations in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2008;99(2):314-20.
330. Chaux A, Albadine R, Toubaji A, Hicks J, Meeker A, Platz EA, et al. Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jul;35(7):1014-20.
331. Darnel AD, Lafargue CJ, Vollmer RT, Corcos J, Bismar TA. TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in Gleason pattern 3 prostate cancer in a Canadian cohort. *Cancer Biol Ther*. 2009 Jan;8(2):125-30.
332. Esgueva R, Perner S, C JL, Scheble V, Stephan C, Lein M, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol*. 2010 Apr;23(4):539-46.
333. Lee K, Chae JY, Kwak C, Ku JH, Moon KC. TMPRSS2-ERG gene fusion and clinicopathologic characteristics of Korean prostate cancer patients. *Urology*. 2010 Nov;76(5):1268 e7-13.
334. Xiao L, Zhu XZ, Wang Y, Gong Y, Guo CC. [TMPRSS2-ERG gene fusion in metastatic prostate cancers: a study of fine needle aspiration specimens]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2011 Jun;40(6):392-6.
335. FitzGerald LM, Agalliu I, Johnson K, Miller MA, Kwon EM, Hurtado-Coll A, et al. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:230.
336. Ribeiro FR, Paulo P, Costa VL, Barros-Silva JD, Ramalho-Carvalho J, Jeronimo C, et al. Cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly up-regulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene. *PLoS One*. 2011;6(7):e22317.
337. Williamson SR, Zhang S, Yao JL, Huang J, Lopez-Beltran A, Shen S, et al. ERG-TMPRSS2 rearrangement is shared by concurrent prostatic adenocarcinoma and prostatic small cell carcinoma and absent in small

- cell carcinoma of the urinary bladder: evidence supporting monoclonal origin. *Mod Pathol*. 2011 Aug;24(8):1120-7.
338. Machado I, Noguera R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Piqueras M, Navarro S, et al. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Dec;18(4):189-99.
339. Salgado R, Llombart B, R MP, Fernandez-Serra A, Sanmartin O, Toll A, et al. Molecular diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans: a comparison between reverse transcriptase-polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization methodologies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Jul;50(7):510-7.
340. Ochs RC, Bagg A. Molecular genetic characterization of lymphoma: Application to cytology diagnosis. *Diagn Cytopathol*. 2012 Jun;40(6):542-55.
341. Rougemont AL, Bouron-Dal Soglio D, Patey-Mariaud de Serre N, Fetni R, Fan L, Barrette S, et al. A t(17;22)(q21;q12) with partial ETV4 deletion in a soft tissue Ewing sarcoma. *Cancer Genet*. 2012 Jan-Feb;205(1-2):55-60.
342. Bao F, Munker R, Lowery C, Martin S, Shi R, Veillon DM, et al. Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. *Mol Diagn Ther*. 2007;11(4):239-45.
343. Hui P, Howe JG, Crouch J, Nimmakayalu M, Qumsiyeh MB, Tallini G, et al. Real-time quantitative RT-PCR of cyclin D1 mRNA in mantle cell lymphoma: comparison with FISH and immunohistochemistry. *Leuk Lymphoma*. 2003 Aug;44(8):1385-94.
344. Eder M, Battmer K, Kafert S, Stucki A, Ganser A, Hertenstein B. Monitoring of BCR-ABL expression using real-time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia*. 1999 Sep;13(9):1383-9.
345. Harnden P, Shelley MD, Clements H, Coles B, Tyndale-Biscoe RS, Naylor B, et al. The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):13-24.

346. Ohori M, Kattan M, Scardino PT, Wheeler TM. Radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2004 Mar;17(3):349-59.
347. Miyagi Y, Sasaki T, Fujinami K, Sano J, Senga Y, Miura T, et al. ETS family-associated gene fusions in Japanese prostate cancer: analysis of 194 radical prostatectomy samples. *Mod Pathol.* 2010 Nov;23(11):1492-8.
348. Jhavar S, Reid A, Clark J, Kote-Jarai Z, Christmas T, Thompson A, et al. Detection of TMPRSS2-ERG translocations in human prostate cancer by expression profiling using GeneChip Human Exon 1.0 ST arrays. *J Mol Diagn.* 2008 Jan;10(1):50-7.
349. Schwartzman J, Mongoue-Tchokote S, Gibbs A, Gao L, Corless CL, Jin J, et al. A DNA methylation microarray-based study identifies ERG as a gene commonly methylated in prostate cancer. *Epigenetics.* 2011 Oct 1;6(10):1248-56.
350. Furusato B, van Leenders GJ, Trapman J, Kimura T, Egawa S, Takahashi H, et al. Immunohistochemical ETS-related gene detection in a Japanese prostate cancer cohort: diagnostic use in Japanese prostate cancer patients. *Pathol Int.* 2011 Jul;61(7):409-14.
351. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res.* 2011 Sep 15;17(18):5878-88.
352. Bismar TA, Dolph M, Teng LH, Liu S, Donnelly B. ERG protein expression reflects hormonal treatment response and is associated with Gleason score and prostate cancer specific mortality. *Eur J Cancer.* 2012 Mar;48(4):538-46.
353. Hoogland AM, Jenster G, van Weerden WM, Trapman J, van der Kwast T, Roobol MJ, et al. ERG immunohistochemistry is not predictive for PSA recurrence, local recurrence or overall survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Mod Pathol.* 2012 Mar;25(3):471-9.
354. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature genetics.* 2006;39(1):41-51.

## BIBLIOGRAFÍA

---

355. Hollenhorst PC, Paul L, Ferris MW, Graves BJ. The ETS gene ETV4 is required for anchorage-independent growth and a cell proliferation gene expression program in PC3 prostate cells. *Genes Cancer*. 2011 Jan 1;1(10):1044-52.
356. Sorensen PHB, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t (21; 22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nature genetics*. 1994;6(2):146-51.
357. Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001 Sep;9(3):255-60.
358. Auprich M, Bjartell A, Chun FK, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol*. 2011 Nov;60(5):1045-54.
359. Wu AK, Reese AC, Cooperberg MR, Sadetsky N, Shinohara K. Utility of PCA3 in patients undergoing repeat biopsy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012 Nov 1.
360. Roobol MJ. Contemporary role of prostate cancer gene 3 in the management of prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2011 May;21(3):225-9.
361. Ankerst DP, Groskopf J, Day JR, Blase A, Rittenhouse H, Pollock BH, et al. Predicting prostate cancer risk through incorporation of prostate cancer gene 3. *J Urol*. 2008 Oct;180(4):1303-8; discussion 8.
362. van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, et al. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int*. 2012 Aug 26.
363. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, et al. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol*. 2004 Jan;171(1):187-91.
364. Wu Q, Parry G. Hepsin and prostate cancer. *Front Biosci*. 2007;12:5052-9.

365. Kube DM, Savci-Heijink CD, Lamblin AF, Kosari F, Vasmatazis G, Chevillie JC, et al. Optimization of laser capture microdissection and RNA amplification for gene expression profiling of prostate cancer. *BMC Mol Biol.* 2007;8:25.
366. Goel MM, Agrawal D, Natu SM, Goel A. Hepsin immunohistochemical expression in prostate cancer in relation to Gleason's grade and serum prostate specific antigen. *Indian J Pathol Microbiol.* 2011 Jul-Sep;54(3):476-81.
367. Pace G, Pomante R, Vicentini C. Hepsin in the diagnosis of prostate cancer. *Minerva Urol Nefrol.* 2012 Jun;64(2):143-8.
368. Stamey TA, Caldwell MC, Fan Z, Zhang Z, McNeal JE, Nolley R, et al. Genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancer: which is the best prostatic control tissue? *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2263-8.
369. Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, et al. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med.* 1998 Aug;4(8):909-14.
370. D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol.* 2001 Jun;158(6):2031-41.
371. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology.* 2002 Dec;60(6):1131-5.
372. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova GS, et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7(6):531-6.
373. Kollermann J, Kempkensteffen C, Helpap B, Schrader M, Krause H, Muller M, et al. Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer. *BMC Urol.* 2006;6:15.
374. Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular

## BIBLIOGRAFÍA

---

- biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91(3):540-52.
375. Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for prostate cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:139-51.
376. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002 Apr 3;287(13):1662-70.
377. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Iczkowski KA, Chu PG, Tretiakova MS, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology.* 2004 Sep;45(3):218-25.
378. Scarpelli M, Mazzucchelli R, Barbisan F, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Cheng L, et al. Is there a role for prostate tumour overexpressed-1 in the diagnosis of HGPIN and of prostatic adenocarcinoma? A comparison with alpha-methylacyl CoA racemase. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012 Jan-Mar;25(1):67-74.
379. Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Hlavna M, Babula P, Hrabec R, et al. Evaluation of alpha-methylacyl-CoA racemase, metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma.* 2012;59(2):191-201.
380. Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Mar;288(3):C494-506.
381. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9937-47.
382. Sainz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, et al. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res.* 2010 Nov;8(11):1489-500.
383. Williams TM, Cheung MW, Park DS, Razani B, Cohen AW, Muller WJ, et al. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell.* 2003 Mar;14(3):1027-42.

384. Freeman MR, Yang W, Di Vizio D. Caveolin-1 and prostate cancer progression. *Adv Exp Med Biol.* 2012;729:95-110.
385. Pflug BR, Reiter RE, Nelson JB. Caveolin expression is decreased following androgen deprivation in human prostate cancer cell lines. *Prostate.* 1999 Sep 1;40(4):269-73.
386. Bachmann N, Haeusler J, Luedeke M, Kuefer R, Perner S, Assum G, et al. Expression changes of CAV1 and EZH2, located on 7q31 approximately q36, are rarely related to genomic alterations in primary prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Apr 15;182(2):103-10.
387. Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I, Lazcano JJ, Samaniego R, Calvo E, et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell.* 2011 Jul 8;146(1):148-63.
388. Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, et al. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res.* 2001 May 15;61(10):3882-5.
389. Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, et al. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25134-45.
390. Steiner I, Jung K, Miller K, Stephan C, Erbersdobler A. Expression of endothelial factors in prostate cancer: a possible role of caveolin-1 for tumour progression. *Oncol Rep.* 2011 Feb;27(2):389-95.
391. Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, et al. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4386-92.
392. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Aug;4(8):1873-80.

## BIBLIOGRAFÍA

---

393. Razani B, Altschuler Y, Zhu L, Pestell RG, Mostov KE, Lisanti MP. Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry*. 2000 Nov 14;39(45):13916-24.
394. Xia H, Khalil W, Kahm J, Jessurun J, Kleidon J, Henke CA. Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. Jun;176(6):2626-37.
395. Bibikova M, Chudin E, Arsanjani A, Zhou L, Garcia EW, Modder J, et al. Expression signatures that correlated with Gleason score and relapse in prostate cancer. *Genomics*. 2007 Jun;89(6):666-72.
396. Salinas CA, Koopmeiners JS, Kwon EM, FitzGerald L, Lin DW, Ostrander EA, et al. Clinical utility of five genetic variants for predicting prostate cancer risk and mortality. *Prostate*. 2009 Mar 1;69(4):363-72.
397. Almeida JC, Menezes RP, Kuckelhaus SA, Bocca AL, Figueiredo F. Prognostic value of morphologic and clinical parameters in pT2 - pT3 prostate cancer. *Int Braz J Urol*. 2007 Sep-Oct;33(5):662-72.
398. Yousef GM, Diamandis EP. Expanded human tissue kallikrein family- a novel panel of cancer biomarkers. *Tumour Biol*. 2002 May-Jun;23(3):185-92.
399. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
400. Goodison S, Sun Y, Urquidi V. Derivation of cancer diagnostic and prognostic signatures from gene expression data. *Bioanalysis*. 2010 May;2(5):855-62.
401. Kosari F, Cheville JC, Ida CM, Karnes RJ, Leontovich AA, Sebo TJ, et al. Shared gene expression alterations in prostate cancer and histologically benign prostate from patients with prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012 Jul;181(1):34-42.

402. Jia Z, Wang Y, Sawyers A, Yao H, Rahmatpanah F, Xia XQ, et al. Diagnosis of prostate cancer using differentially expressed genes in stroma. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2476-87.
403. Stuart RO, Wachsman W, Berry CC, Wang-Rodriguez J, Wasserman L, Klacansky I, et al. In silico dissection of cell-type-associated patterns of gene expression in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 13;101(2):615-20.
404. Marin-Aguilera M, Codony-Servat J, Kalko SG, Fernandez PL, Bermudo R, Buxo E, et al. Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010 Feb;11(2):329-39.
405. Wang XD, Reeves K, Luo FR, Xu LA, Lee F, Clark E, et al. Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol.* 2007;8(11):R255.
406. Yu YP, Landsittel D, Jing L, Nelson J, Ren B, Liu L, et al. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol.* 2004 Jul 15;22(14):2790-9.
407. Lehmusvaara S, Erkkila T, Urbanucci A, Waltering K, Seppala J, Larjo A, et al. Chemical castration and anti-androgens induce differential gene expression in prostate cancer. *J Pathol.* 2012 Jul;227(3):336-45.
408. Penney KL, Sinnott JA, Fall K, Pawitan Y, Hoshida Y, Kraft P, et al. mRNA expression signature of Gleason grade predicts lethal prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 10;29(17):2391-6.
409. Ross AE, Marchionni L, Vuica-Ross M, Cheadle C, Fan J, Berman DM, et al. Gene expression pathways of high grade localized prostate cancer. *Prostate.* 2011 Feb 25.
410. Markert EK, Mizuno H, Vazquez A, Levine AJ. Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 28.
411. Dhanasekaran SM, Dash A, Yu J, Maine IP, Laxman B, Tomlins SA, et al. Molecular profiling of human prostate tissues: insights into gene

- expression patterns of prostate development during puberty. *FASEB J.* 2005 Feb;19(2):243-5.
412. Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem.* 1996 Mar 15;236(3):827-36.
413. Bjartell A, Montironi R, Berney DM, Egevad L. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. *Acta Oncol.* Jun;50 Suppl 1:76-84.
414. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5246-50.
415. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi F, McLeod DAG, Moul JW. Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *The Journal of urology.* 1996;156(3):1064-8.
416. Nikoleishvili D, Pertia A, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A. Expression of p27((Kip1)), cyclin D3 and Ki67 in BPH, prostate cancer and hormone-treated prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol.* 2008;40(4):953-9.
417. Ojea Calvo A, Mosteiro Cervino MJ, Dominguez Freire F, Alonso Rodrigo A, Rodriguez Iglesias B, Benavente Delgado J, et al. [The usefulness of Ki67 expression in the biopsy specimens, to predict the biochemical progresion of the prostate cancer after radical prostatectomy]. *Actas Urol Esp.* 2004 Oct;28(9):650-60.
418. Rubio J, Ramos D, Lopez-Guerrero JA, Iborra I, Collado A, Solsona E, et al. Immunohistochemical expression of Ki-67 antigen, cox-2 and Bax/Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol.* 2005 Nov;48(5):745-51.
419. Ummanni R, Teller S, Junker H, Zimmermann U, Venz S, Scharf C, et al. Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells. *FEBS J.* 2008 Nov;275(22):5703-13.

420. Zhang D, Li L, Zhang LL, Xue Y, Wang XY, He DL. [Impact of PrLZ overexpression on invasion of prostate cancer LNCaP cells in vitro]. *Ai Zheng*. 2009 May;28(5):483-6.
421. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 1;28(1):126-31.
422. Dall'Era MA, Cooperberg MR, Chan JM, Davies BJ, Albertsen PC, Klotz LH, et al. Active surveillance for early-stage prostate cancer: review of the current literature. *Cancer*. 2008 Apr 15;112(8):1650-9.
423. Lujan Galan M, Paez Borda A, Cabeza Rodriguez MA, Espinales Castro GM, Romero Cagigal I, Escalera Almendros CA, et al. [Natural history of localized prostate cancer. Preliminary data on progression and mortality]. *Actas Urol Esp*. 2004 May;28(5):354-63.
424. Fukunaga-Johnson N, Sandler HM, McLaughlin PW, Strawderman MS, Grijalva KH, Kish KE, et al. Results of 3D conformal radiotherapy in the treatment of localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997 May 1;38(2):311-7.
425. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, Stack EC, et al. The TMPRSS2:ERG Rearrangement, ERG Expression, and Prostate Cancer Outcomes: a Cohort Study and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jun 26.
426. Kruck S, Gakis G, Stenzl A. Circulating and disseminated tumor cells in the management of advanced prostate cancer. *Adv Urol*. 2011;2012:135281.
427. Yin JA, Grimwade D. Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2002 Jul 13;360(9327):160-2.
428. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*. 2003 Nov 1;57(3):205-25.
429. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.

## BIBLIOGRAFÍA

---

430. Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Haltom E, et al. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*. 1994 Dec;12(12):2634-9.
431. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra3.
432. Attard G, de Bono JS, Clark J, Cooper CS. Studies of TMPRSS2-ERG gene fusions in diagnostic trans-rectal prostate biopsies. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1340; author reply
433. Liu W, Laitinen S, Khan S, Vihinen M, Kowalski J, Yu G, et al. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med*. 2009 May;15(5):559-65.
434. Ang JE, Olmos D, de Bono JS. CYP17 blockade by abiraterone: further evidence for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer. *British journal of cancer*. 2009;100(5):671-5.
435. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1416-34.
436. Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):2267-78.
437. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002 Oct;16(10):2115-21.

# APÉNDICE



## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS:

- Rubio-Briones J, **Fernández-Serra A**, Calatrava A, García-Casado Z, Rubio L, Bonillo MA, Iborra I, Solsona E, López-Guerrero JA. “Clinical implications of TMPRSS2-ERG gene fusion expression in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy”. *J Urol*. 2010 May;183(5):2054-61. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20303538
- Salgado R, Llombart B, M Pujol R, **Fernández-Serra A**, Sanmartín O, Toll A, Rubio L, Segura S, Barranco C, Serra-Guillén C, Yébenes M, Salido M, Traves V, Monteagudo C, Sáez E, Hernández T, de Álava E, Llombart-Bosch A, Solé F, Guillén C, Espinet B, López-Guerrero JA. “Molecular diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans: a comparison between reverse transcriptase-polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization methodologies”. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Jul;50(7):510-7. doi: 10.1002/gcc.20874. Epub 2011 Apr 11. PMID: 21484928
- **Fernández-Serra A**, Rubio-Briones J, García-Casado Z, Solsona E, López-Guerrero JA. “Prostate cancer: the revolution of the fusion genes”. *Actas Urol Esp*. 2011 Jul-Aug;35(7):420-8. doi: 10.1016/j.acuro.2010.11.019. Epub 2011 May 23. Review. Spanish. PMID: 21601955
- Rubio-Briones J, **Fernández-Serra A**, Ramírez M, Rubio L, Collado A, Casanova J, Gómez-Ferrer A, Ricós JV, Monrós JL, Dumont R, Ortiz B, Iborra I, García-Casado Z, Solsona E, López-Guerrero JA “Outcomes of expanded use of PCA3 testing in a Spanish population with clinical suspicion of prostate cancer”. *Actas Urol Esp*. 2011 Nov-Dec;35(10):589-96. Epub 2011 Jun 22. Spanish. PMID: 21700365
- Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, **Fernández-Serra A**, López-Guerrero JA: “miRNAs as biomarkers in prostate cancer”. *Clin Transl Oncol*. 2012 Nov;14(11):803-11. doi: 10.1007/s12094-012-0877-0. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22855165
- **A Fernández-Serra**, L. Rubio, A. Calatrava, J. Rubio-Briones, R. Salgado, R. Gil-Bensó, B. Espinet, Z. García-Casado, JA López-Guerrero. “Molecular characterization and clinical impact of the TMPRSS2-ERG rearrangement in Prostate cancer: comparison between FISH and RT-PCR”. *BioMed Research International* (enviado).