

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Programa: CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES (040F)

**VALOR PRONÓSTICO DEL GEN DE FUSIÓN
TMPRSS2-ERG, METILACIÓN DE PITX2 Y
MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN EL
CÁNCER DE PRÓSTATA**

Tesis Doctoral

Presentada por
Cristina Ferrandis Cortes

Dirigida por
José María Martínez Jabaloyas
David Ramos Soler

Valencia

2015

D. José María Martínez Jabaloyas, Jefe de Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

D. David Ramos Soler, médico adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Certifican que:

La presente tesis doctoral “Valor pronóstico del gen de fusión TMPRSS2-ERG, metilación de PITX2 y marcadores inmunohistoquímicos en el cáncer de próstata.” ha sido realizada por Cristina Ferrandis Cortes en el Servicio de Urología del Hospital Clínico de Valencia, en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia y Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, 24 de Septiembre de 2015.

Fdo: D. José María Martínez Jabaloyas

Fdo: D. David Ramos Soler

AGRADECIMIENTOS

Después de tantos años con la tesis son muchas las personas que han hecho posible que pudiera ver su fin y a las que debo mi sincero agradecimiento.

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. José María Martínez Jabaloyas, sin el que este proyecto ni tan siquiera se habría gestado. Gracias por ser el promotor, incentivador y supervisor en todo el trabajo, desde el primer día hasta el último. Porque tus ganas de hacer de los que te rodean mejores urólogos e investigadores al final se convierten en hechos, aunque lleve su tiempo. Y espero que ir viendo resultados de tanto esfuerzo te estimule para seguir transmitiendo esas ganas de trabajar.

Al Dr. David Ramos Soler, por ser la persona que me ha guiado en el interesante mundo de la anatomía patológica, gracias por tu tiempo entre cristales y tinciones.

A Lara, por tantas horas dedicadas a esta tesis. Creo que no eres consciente de hasta qué punto esta tesis no hubiera podido terminarse sin tu colaboración. Has sido el impulso verdadero, el timón y la vela. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mi.

A mis compañeros de Urología del Hospital de la Ribera, por ser tan considerados y ofrecerme todo el tiempo del mundo. Cada granito de arena en forma de tardes y guardias para mí se convertía en esperanza.

A José Luís, por ser mi apoyo moral en todo momento, mi confesor y mi diseñador personal. Nadie sabe mejor que tú lo que ha costado esta tesis, y nunca podré olvidar todos los momentos buenos y malos que hemos compartido.

A Javier, por ser un gran profesional en todo lo que hace, porque sus conocimientos en informática, su meticulosidad y por los ánimos recibidos.

A mi familia y amigos que me han apoyado siempre, y que han confiado en mí y en mis posibilidades en todo momento.

En fin, todo lo que pueda decir se queda corto para expresar lo agradecida y orgullosa que estoy por el equipo humano que me ha rodeado; por fin veo la luz al final del camino.

ÍNDICE

GLOSARIO

INTRODUCCIÓN	1
1. Epidemiología y factores de riesgo en el cáncer de próstata	3
2. Diagnóstico del cáncer de próstata	4
2.1. Antígeno prostático específico (PSA)	4
2.2. Tacto rectal	5
2.3. Biopsia prostática	5
3. Estadificación del cáncer de próstata	6
3.1. Extensión tumoral	8
3.2. Estadificación ganglionar	8
3.3. Estadificación metástasis	9
4. Grupos de riesgo en el cáncer de próstata	10
5. Cáncer de próstata clínicamente insignificante	11
6. Diagnóstico anatomopatológico en el cáncer de próstata	11
6.1. Tipos histológicos	11
6.2. Gleason score	12
6.3. Neoplasia intraepitelial de alto grado y atipia de pequeños acinos	15
6.3.1. Neoplasia intraepitelial de alto grado	15
6.3.2. Atipia de pequeños acinos	15
6.4. Anatomía patológica de la pieza de prostatectomía	16
6.4.1. Gleason de la pieza	16
6.4.2. Estadio patológico	16
6.4.3. Márgenes quirúrgicos	17
6.4.4. Invasión perineural	17
7. Tratamiento del cáncer de próstata	18
7.1. Tratamiento diferido	18
7.1.1. Actitud expectante	18
7.1.2. Vigilancia activa	19

7.2. Prostatectomía radical	20
7.3. Radioterapia	20
7.3.1. Radioterapia externa	20
7.3.2. Braquiterapia	20
7.4. Hormonoterapia	21
7.5. Otras alternativas	21
8. Seguimiento	22
8.1. Concepto de recidiva bioquímica	22
8.2. Esquema de seguimiento	22
9. Factores pronósticos clásicos en el cáncer de próstata	23
10. Cáncer de próstata resistente a la castración	25
11. Nuevos marcadores en el cáncer de próstata	26
11.1. Marcadores inmunohistoquímicos en el cáncer de próstata	27
11.1.1. Fosfatasa ácida prostática	27
11.1.2. PSA	29
11.1.3. Racemasa (P504S)	29
11.1.4. Receptor androgénico	31
11.1.5. ERG	32
11.1.6. Beta-catenina	32
11.1.7. PSMA	34
11.1.8. p53	34
11.1.9. Topoisomerasa-II α	35
11.1.10. E-cadherina	36
11.2. Gen de fusión TMPRSS2-ETS	36
11.2.1. Mecanismos moleculares del cáncer	36
11.2.2. Estructura del gen	37
11.2.3. Concepto de proto-oncogén y oncogén	38
11.2.4. Genes supresores tumorales	38
11.2.5. Transmisión de la información génica	39
11.2.6. Genes de fusión	40
11.2.7. Gen de fusión TMPRSS2-ETS	42

11.2.7.1. TMRSS2	42
11.2.7.2. ETS	43
11.2.7.3. TMRSS2-ETS	44
11.2.8. Implicaciones clínicas del gen de fusión TMRSS2-ERG	53
11.3. Estudio epigenético en el cáncer de próstata	58
11.3.1. Concepto de epigenética	58
11.3.2. Epigenética y cáncer de próstata	59
11.3.3. PITX2 y cáncer de próstata	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. Selección de pacientes	69
2. Matrices de tejido y estudio inmunohistoquímico	70
2.1. Recogida de bloques y preparaciones histológicas: selección de áreas.....	71
2.2. Confección de planillas	72
2.3. Preparación de las matrices	72
2.4. Consolidación del bloque	73
2.5. Técnica inmunohistoquímica	74
2.6. Valoración del patrón de tinción	77
3. Biología molecular: Gen de fusión TMRSS2-ERG	79
3.1. Aislamiento de ARN	79
3.2. Cuantificación de la concentración de ARN	80
3.3. Protocolo de purificación de ARN por precipitación.....	82
3.4. PCR cuantitativa en Tiempo Real	83
3.4.1. Transcripción reversa	83
3.4.2. Cuantificación relativa por PCR a tiempo real	85
3.4.3. Método de cunatificación	89
3.5. Secuenciación	90
3.5.1. Técnica de la PCR	91
3.5.2. Purificación de los productos de PCR	94

3.5.3. Reacción de secuenciación	94
3.5.4. Purificación de la reacción de secuenciación	95
3.5.5. Secuenciación y análisis	95
4. Estudio de la metilación del ADN	96
4.1. Análisis de la metilación del gen PITX2	96
4.2. Epi typer (Sequenom)	97
4.3. Selección de amplicón	98
4.4. Metodología del análisis	100
5. Análisis de resultados	101
5.1. Estadística descriptiva	101
5.2. Estadística analítica	101
5.3. Análisis de supervivencia	102
RESULTADOS	105
1. Estadística descriptiva	107
1.1. Variables clínico-patológicas	107
1.2. Marcadores inmunohistoquímicos	108
1.3. Determinación de TMRSS2-ERG por qPCR	112
1.4. Metilación del gen PITX2	115
2. Análisis univariante	116
2.1. Marcadores inmunohistoquímicos y variables clínico-patológicas	116
2.2. Análisis de TMRSS2-ERG y variables clínico-patológicas	128
2.3. Metilación de PITX2 y variables clínico-patológicas	130
2.4. Correlación entre marcadores IHQ y gen de fusión TMRSS2-ERG	134
2.5. Correlación entre metilación de PITX2 y gen de fusión TMRSS2-ERG	136
2.6. Relación entre ERG y metilación de PITX2	136
3. Estudio de supervivencia	137
3.1. Análisis univariante de supervivencia	137
3.2. Análisis multivariante de supervivencia	144
DISCUSIÓN	145

1. Nuestra serie	147
2. Expresión de marcadores inmunohistoquímicos	150
3. Gen de fusión <i>TMPRSS2-ERG</i>	159
4. Metilación del gen <i>PITX2</i>	162
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA.....	171
ANEXO	209

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
AE: Actitud expectante
AMACR: Alfa-metilCoA Racemasa
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
AP: Anatomía Patológica
bP: Pares de bases
BP: Biopsia prostática
CaP: Cáncer de Próstata
CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración
DM: Diabetes Mellitus
EEC: Extensión extracapsular
ERM: Espectroscopia por resonancia magnética
ERSPC: Estudio randomizado europeo de cáncer de próstata
ETR: Ecografía transrectal
FFPE: Piezas fijadas en formol e incluidas en parafina
FISH: Hibridación fluorescente *in situ*
HBP: Hiperplasia benigna de próstata
H-E: Hematoxilina-Eosina
HTA: hipertensión arterial
IHQ: inmunohistoquímico
IMC: Índice de masa corporal
IPN: Invasión perineural
KDa: Kilo Dalton
LDLRA: Dominio clase A del receptor LDL
Mb: Megabase
McaPE: Mortalidad cáncer de próstata específica
MQP: Márgenes quirúrgicos positivos
PCA3: Gen antígeno 3
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PCRq: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PSA: Antígeno prostático Específico
PSAd: Densidad de PSA

PSADT: Tiempo de duplicación de PSA
PSA: PSA libre
PSAv: Velocidad de PSA
PR: Prostatectomía radical
PRL: Prostatectomía radical laparoscópica
PRR: Prostatectomía radical retropúbica
PRRB: Prostatectomía radical robótica
P504S: Alfa-metilCoA Racemasa
RBq: Recidiva bioquímica
RCI: Recidiva clínica
RM: Resonancia magnética
RM-e: Resonancia magnética endorectal
RMM: Resonancia magnética multiparamétrica
rpm: Revoluciones por minuto
RT-PCR: PCR cualitativa
RTUP: Resección transuretral de próstata
SLRBq: Supervivencia libre de recidiva bioquímica
SRCR: Dominio receptor-*scavenger* rico en cisteína
SVCaPE: Aupervivencia cáncer específica
TC: Tomografía computerizada
TR: Tacto Rectal
UFAI: Ultrasonidos focalizados de alta intensidad
VA: Vigilancia activa

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (CaP) constituye uno de los problemas sanitarios más importantes en los países desarrollados. Su incidencia ha ido en aumento en las últimas décadas, por una parte como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, y por otra, por el desarrollo de técnicas diagnósticas que han permitido la detección de tumores asintomáticos que previamente pasaban desapercibidos.

Mundialmente se estima que unos 285.100 varones mueren como consecuencia de esta patología, 89.600 en Europa y 32.600 en Norteamérica¹.

En España, según los datos del Registro Nacional de CaP realizado por 25 centros españoles en el 2010, la cifra de nuevos diagnósticos anuales es de 4.087 en una población de referencia de 4.933.940 (21,8% de la población de varones en España), lo que supone una incidencia estimada para el CaP de 70,75 casos por 100.000 hombres².

A pesar de ser una entidad común, la etiología y los factores relacionados con la evolución tumoral son hoy en día poco conocidos, si bien se considera un proceso multifactorial relacionado con ciertas exposiciones ambientales, estilos de vida, antecedentes familiares y factores genéticos.

Los únicos factores de riesgo demostrados como causantes de CaP son la edad avanzada, la historia familiar de CaP y la etnia africana³. Algunos estudios apuntan la importancia de la base genética de la enfermedad, la cual condiciona tanto la susceptibilidad a la misma como la agresividad clínica⁴. Sin embargo, hay otros factores como la actividad física y sexual, la exposición al cadmio y radiación ultravioleta, el hábito tabáquico, el consumo de alcohol, la dieta rica en grasas saturadas de origen animal y el consumo de carne roja, de los que se desconoce el papel que juegan en el desarrollo del CaP⁵⁻⁶. También es controvertido el síndrome metabólico como agente etiológico del CaP. Meta-análisis recientes no encuentran relación del síndrome en conjunto pero sí de sus componentes de forma individualizada, como es el caso de la hipertensión arterial (HTA) o la circunferencia de la cintura. Algunos trabajos establecen el papel dual de la obesidad en el CaP, de forma que el riesgo se reduce para el CaP localizado pero a mayor índice de masa corporal (IMC), mayor es el riesgo de CaP avanzado⁷. En relación a la Diabetes Mellitus (DM), se ha descrito una posible asociación

entre ésta y el CaP, mostrando una relación inversa entre ambas entidades⁸.

En conclusión, podemos decir que los factores endógenos, inherentes al individuo, son determinantes en el desarrollo del cáncer de próstata, mientras que los factores exógenos podrían tener un papel desencadenante en la aparición del mismo. Sin embargo, hoy en día no hay suficiente evidencia al respecto como para hacer recomendaciones sobre el estilo de vida, pues no sabemos qué grado de repercusión podrían tener en el desarrollo de esta patología.

2. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Para llegar al diagnóstico del CaP las herramientas que se utilizan actualmente son el valor del antígeno prostático específico (PSA) y el tacto rectal (TR), siendo necesaria la confirmación diagnóstica mediante la realización de una biopsia prostática (BP) en aquellos casos en los que exista un PSA elevado y/o un TR sospechoso.

2.1 Antígeno prostático específico (PSA)

El PSA es una glucoproteína con actividad calicreína que se sintetiza fundamentalmente en las células epiteliales prostáticas. Su acción fisiológica es la licuación del coágulo seminal, resultando de ello un incremento de la motilidad espermática⁹.

La concentración de PSA en el líquido seminal es muy elevada, sin embargo, en condiciones normales en sangre periférica es mínima. Las alteraciones en la arquitectura glandular y la neoangiogénesis pueden ser los factores más importantes que justifican un incremento de la eliminación de PSA al torrente circulatorio¹⁰.

El punto de corte de 4 ng/mL de PSA sérico ha sido y es el valor más utilizado para la detección y monitorización del cáncer de próstata. Sin embargo, Partin y cols. demostraron un porcentaje de pacientes inesperadamente alto de casos con cáncer de próstata en pacientes con cifras de PSA entre 2 y 4 ng/mL¹¹. Es por ello que hoy en día se tienen en cuenta diferentes factores a la hora de establecer el punto de corte de PSA, entre ellos la edad del paciente.

A pesar de que el PSA es un marcador que ha ayudado al diagnóstico temprano de la enfermedad, reduciendo de forma significativa las muertes por CaP, sigue siendo elevada la mortalidad, dado que tiene como limitación fundamental que se trata de un marcador próstata-específico pero no cáncer-específico¹². Por este motivo se han desarrollado nuevas fórmulas, basadas en la cuantificación sérica de PSA, que pretenden incrementar su

especificidad, manteniendo una tasa de detección (sensibilidad) similar. Las principales son la densidad de PSA¹³, la velocidad de PSA¹⁴⁻¹⁵, el tiempo de duplicación del PSA¹⁶, los rangos de PSA específicos por edad¹⁷ y las diferentes formas moleculares de PSA, como el PSA libre¹⁸⁻¹⁹.

2.2 Tacto rectal

Desde la introducción del PSA, el TR ha perdido protagonismo en su papel diagnóstico en el CaP. La mayor parte de los CaP se localizan en la zona periférica de la próstata y pueden detectarse mediante TR a partir de volúmenes tumorales de unos 0,2 ml. Un TR sospechoso es una indicación absoluta de BP pues en aproximadamente el 18 % de los pacientes se detecta un CaP a partir de un TR patológico, con independencia de la concentración de PSA²⁰.

2.3 Biopsia prostática

Las indicaciones de la BP vienen derivadas del resultado del PSA y del TR, matizadas por otros factores como pueden ser la edad del paciente, el cociente PSAI/PSAt, la densidad de PSA, y el volumen prostático.

Cualquier alteración del TR y/o unas cifras de PSA superiores a los niveles patológicos considerados, son indicación de biopsia en varones con una expectativa de vida superior a los 10 años.

La biopsia estándar se realiza guiándose mediante ecografía transrectal (E/TR). Se puede realizar con anestesia local mediante bloqueo de los haces neurovasculares periprostáticos, localizados en el ángulo formado entre las vesículas seminales y la base prostática. Como anestésicos locales podemos utilizar la mepivacaína o lidocaína²¹.

Actualmente los esquemas de biopsia que se consideran adecuados son aquellos que incluyen un mínimo de 10 cilindros. No obstante, hay algunos esquemas de biopsia que toman como factor determinante del número de cilindros el volumen prostático. De hecho, se han publicado nomogramas, como el de Remzi y cols. conocido como nomograma de Viena, el cual constituye una estrategia para el determinar el número óptimo de cilindros que permite reducir el número de biopsias innecesarias, teniendo en cuenta por igual la edad del paciente y el volumen prostático²².

3. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Hay que diferenciar el estadiaje clínico (Tc) (Tabla 1), el cual obtenemos mediante el TR, PSA y otras técnicas de imagen complementarias (como la gammagrafía ósea, la tomografía computarizada o resonancia magnética), del estadiaje patológico (Tp), el cual obtendremos a partir del estudio anatomopatológico (AP) de la pieza de prostatectomía radical (PR). Tanto para el sistema de clasificación clínico como patológico, el sistema de estadificación que se utiliza actualmente es el de tumor, ganglios y metástasis, conocido como TNM²³.

Tabla 1: TNM clínico de cáncer de próstata (AJCC 2010)

T - Tumor primario	
TX	No se puede evaluar el tumor primario
To	Ausencia de datos de tumor primario
T1	Tumor clínicamente inaparente no palpable ni visible en las pruebas de imagen
T1a	El tumor es un hallazgo histológico fortuito en el 5 % o menos del tejido reseado
T1b	El tumor es un hallazgo histológico fortuito en más del 5 % del tejido reseado
T1c	Tumor identificado en una biopsia por punción (por ejemplo, debido a una concentración elevada de antígeno prostático específico [PSA])
T2	Tumor limitado a la próstata ¹
T2a	El tumor afecta a la mitad de un lóbulo o menos
T2b	El tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no a los dos lóbulos
T2c	El tumor afecta a los dos lóbulos
T3	El tumor se extiende a través de la cápsula prostática ²
T3a	Extensión extracapsular (uni o bilateral), incluida la afectación microscópica del cuello de la vejiga
T3b	El tumor invade una o ambas vesículas seminales
T4	El tumor está fijo o invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores o pared de la pelvis
N - Ganglios linfáticos regionales³	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
No	Ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis ganglionares regionales
M - Metástasis a distancia⁴	
MX	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
Mo	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Ganglios linfáticos no regionales
M1b	Huesos
M1c	Otros focos

¹Un tumor hallado en uno o ambos lóbulos mediante una biopsia por punción, pero que no es palpable ni visible en las pruebas de imagen, se clasifica como T1c.

²La invasión del vértice de la próstata, o de la cápsula prostática (pero sin sobrepasarla), no se clasifica como pT3, sino como pT2.

³Las metástasis no mayores de 0,2 cm pueden designarse pN1 mi.

⁴Cuando exista más de un foco de metástasis, debe utilizarse la categoría más avanzada.

3.1 Extensión tumoral (T)

El primer nivel en la estadificación es la evaluación del estadio tumoral local, donde es importante la diferenciación entre enfermedad intracapsular (T1-T2) y extracapsular (T3-T4) de cara a decidir cuál es la mejor opción terapéutica. Ni el TR, ni el PSA, ni la ETR son capaces de aportar de forma fiable información relativa a la afectación local, de forma que las técnicas que se recomiendan hoy en día, son la tomografía computerizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Esta última aporta mejor información sobre la uni o bilateralidad, la extensión extracapsular y afectación de vesículas seminales así como la invasión de estructuras vecinas (vejiga, recto, esfínter anal, músculo elevador del ano, pared pélvica)²⁴.

Han surgido en los últimos años variantes de la RM que han permitido una mayor eficiencia en el estadiaje local del CaP. Es el caso la RM endorrectal (RM-e)²⁵⁻²⁷, la espectroscopia (ERM)²⁸ o la RM multiparamétrica.

3.2 Estadificación ganglionar (N)

La estadificación ganglionar sólo debe realizarse cuando los resultados vayan a influir directamente en una decisión terapéutica y esto suele ocurrir en los pacientes en los que se plantean tratamientos potencialmente curativos. Los valores elevados de PSA, el estadiaje (a partir de T2b-T3) y el Gleason mayor a 6 se han asociado a un mayor riesgo de metástasis ganglionares²⁹⁻³¹.

En la bibliografía actual, los resultados indican que la TC y la RM ofrecen resultados similares en cuanto a la detección de metástasis ganglionares pélvicas, aunque la TC parece ligeramente superior³²⁻³³.

Se han propuesto también otras técnicas de imagen para mejorar el diagnóstico de adenopatías como la RM de alta resolución (útil para la detección de metástasis ganglionares ocultas³⁴ o el uso de radioinmuno gammagrafía, sin embargo se necesitan más estudios para poder recomendar su uso de forma sistemática en la práctica clínica³⁵.

A pesar de disponer de diferentes modalidades de técnicas de imagen, el método de referencia para la estadificación N sigue siendo la linfadenectomía quirúrgica, ya sea mediante técnica abierta, laparoscópica o robótica³⁶.

Por otra parte, en los últimos años se está estudiando la utilidad del ganglio centinela en el cáncer de próstata. La exéresis de éste, definido como el primer ganglio linfático que recibe el drenaje linfático del CaP, tiene el objetivo principal de disminuir la morbilidad asociada a una linfadenectomía pélvica ampliada, sin modificar la sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad metastásica³⁷.

3.3 Estadificación metástasis (M)

Las metástasis en el cáncer de próstata son fundamentalmente óseas, y en particular lesiones blásticas. La técnica de imagen utilizada de forma rutinaria es la gammagrafía ósea. Pero además del hueso, el CaP puede metastatizar a cualquier órgano, si bien afecta con mayor frecuencia a ganglios linfáticos distantes, pulmón, hígado, cerebro y piel. La exploración física, la radiografía de tórax, ecografía, TC y RM son métodos de investigación apropiados, aunque sólo cuando los síntomas sugieren la posibilidad de metástasis en tejidos blandos.

Los estudios han demostrado que la PET/TC con ¹⁸F-fluoruro es una modalidad de imagen sensible y específica para detectar metástasis óseas. Sin embargo, no se han obtenido resultados definitivos, por lo que no pueden hacerse recomendaciones concluyentes³⁸.

En la actualidad, el PSA es el marcador de elección para monitorización de lesiones metastáticas³⁹. Existe buena correlación entre el PSA sérico y la gammagrafía ósea en pacientes con un CaP no tratado. Los resultados de diferentes estudios indican que una gammagrafía ósea de estadificación es innecesaria cuando la concentración sérica de PSA es inferior a 20 ng/ml en pacientes asintomáticos con tumores bien o moderadamente diferenciados. Por el contrario, en los pacientes con tumores poco diferenciados y enfermedad localmente avanzada, debería obtenerse una gammagrafía ósea de estadificación con independencia del valor sérico de PSA⁴⁰⁻⁴¹.

4. GRUPOS DE RIESGO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Inicialmente todos los cánceres de próstata localizados se diferenciaban únicamente en función del PSA o de la histología, sin considerar otros factores en la toma de decisiones, a excepción de la edad. Posteriormente, se trató de individualizar el tratamiento en función de las características de cada paciente. El primero en definir los grupos de riesgo fue D'Amico a finales de los noventa, clasificando a los pacientes en función de los resultados del TR, el PSA y el índice de Gleason⁴² (Tabla 2).

Tabla 2: Grupos de riesgo en el cáncer de próstata según D'Amico.

Bajo riesgo	Riesgo intermedio	Alto riesgo	
PSA < 10 ng/mL y GS < 7 y cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL ó GS 7 ó cT2b	PSA > 20 ng/mL ó GS > 7 ó cT2c	cualquier PSA cualquier GS cT3-4 ó cN+
Localizado			Localmente avanzado

A partir de los grupos definidos por D'Amico, han surgido otras clasificaciones en relación con los grupos de riesgo, una de las más utilizadas es la de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)⁴³ (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de grupos de riesgo de la NCCN.

Muy Bajo Riesgo	cT1c y Gleason < 7 y PSA < 10 ng/mL y < 3 cilindros de biopsia (+) con ≤ 50% afectado en cada uno y PSAD < 0,15 ng/mL/cc
Bajo Riesgo	cT1-cT2a y Gleason < 7 y PSA < 10 ng/mL
Riesgo Intermedio	cT2b-cT2c ó Gleason 7 ó PSA: 10-20 ng/mL
Alto riesgo	cT3a ó Gleason > 7 ó PSA > 20 ng/mL o bien 2 o los tres parámetros del Riesgo Intermedio en un mismo paciente
Muy Alto Riesgo	cT3b-cT4 o bien 2 o los tres parámetros del Alto Riesgo en un mismo paciente

Estas clasificaciones se utilizan de forma habitual en las guías clínicas urológicas puesto que son de utilidad para el manejo del paciente con diagnóstico de cáncer de próstata.

5. CANCER DE PRÓSTATA CLÍNICAMENTE INSIGNIFICANTE

Con la llegada del PSA aumentó dramáticamente la prevalencia del CaP, de manera que se diagnosticaban tumores clínicamente insignificantes, es decir, tumores que previsiblemente no iban a presentar manifestaciones clínicas en un periodo prolongado o en la vida del paciente⁴⁴.

Epstein, en la década de los 90, establece unos criterios para definir al CaP insignificante basándose principalmente en los datos obtenidos de la BP⁴⁵:

- Gleason ≤ 6 (No patrón 4,5)
- <3 cilindros afectados
- Ningún cilindro $>50\%$ afectado
- <3 mm de cáncer en cualquier cilindro
- PSAd <0.15

Posteriormente, el grupo de Epstein en el 2004 hizo una revisión de estos criterios corroborando que eran una herramienta útil para la toma de decisiones terapéuticas del paciente diagnosticado de CaP⁴⁶.

Dado que hoy en día se busca la mejora de la calidad de vida del paciente, es importante poder diferenciar los tumores indolentes de los agresivos con el fin de evitar el sobrettratamiento, el cual va en detrimento de la misma de una forma considerable.

6. DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

6.1 Tipos histológicos

El diagnóstico del CaP se basa fundamentalmente en el estudio histológico de los cilindros obtenidos en la BP. La mayoría de los diagnósticos anatomopatológicos, más de un 95%, corresponden al adenocarcinoma de próstata tipo acinar convencional. Existe otros tipos histológicos diferentes mucho menos frecuentes, que pueden ser identificados en la biopsia de próstata⁴⁷:

- Adenocarcinoma de próstata ductal
- Adenocarcinoma de próstata mucinoso
- Adenocarcinoma de próstata con células en anillo de sello
- Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma de células pequeñas
- Carcinoma sarcomatoide
- Carcinoma urotelial (afectando ductos y acinis prostáticos sin invasión estromal con lo cual puede ser de origen vesical, o afectando acinis y estroma o primario uretral prostático)
- Carcinoma adenoide quístico

6.2 Gleason Score

El sistema de Gleason se trata de un sistema de puntuación que considera las características citológicas y arquitecturales de los tumores. Se definieron inicialmente 5 patrones⁴⁸ (Figura 1):

- Patrón 1: Glándulas uniformes bien diferenciadas, empaquetadas en grupos con límites relativamente bien definidos.
- Patrón 2: Glándulas bien diferenciadas pero menos uniformes, con estroma interglandular, agrupadas y con bordes poco definidos.
- Patrón 3: Glándulas moderadamente diferenciadas de tamaño variable creciendo de manera infiltrativa, con áreas papilares o cribiformes.
- Patrón 4: Glándulas fusionadas con crecimiento infiltrativo, de límites no definidos, con células de citoplasma claro hipernefromatoide.
- Patrón 5: Carcinoma anaplásico con mínima diferenciación glandular infiltrando difusamente el estroma prostático.

Para obtener la puntuación de Gleason se deben sumar dos patrones, por una parte uno primario, el más frecuente, y otro secundario, el minoritario. De la suma de ambos se obtiene una puntuación total de Gleason.

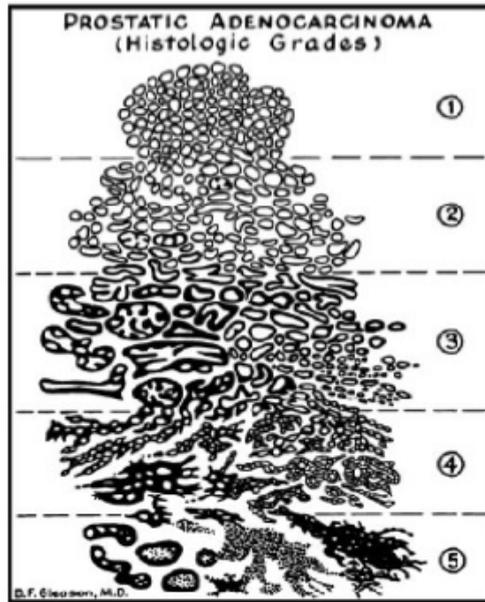


Figura 1: Clasificación de Gleason 1992.

Tras la llegada del PSA hubo un nuevo enfoque del cáncer de próstata que obligó a los anatomopatólogos a realizar una revisión del sistema de puntuación de Gleason, realizada en la reunión de Consenso sobre Gleason de la ISUP del 2005⁴⁹ de forma que hoy en día se conoce como Gleason modificado e incluye las siguientes correcciones (Figura 2):

- La asignación del Gleason en biopsia transrectal no es igual que en prostatectomía.
- No es posible diagnosticar los patrones 1 y 2 en la biopsia transrectal
 - o Imposibilidad de valorar los bordes de la lesión
 - o Confusión con hiperplasia glandular atípica
- La histología cribriforme es grado 3 si hay buena circunscripción y bordes regulares, si no es grado 4
- El grado 4 incluye
 - o patrón cribriforme irregular
 - o microacinos fusionados
 - o glándulas con lúmenes mal formados
 - o histología hipernefrotomatoide
- El grado 5 no cambia
- Se debe ignorar el patrón secundario de menor grado si <5% del área tumoral

- Se debe incluir en el índice de Gleason cualquier patrón secundario de mayor grado incluso si es <5%
- Si hay patrones terciarios, el índice de Gleason final se obtiene sumando el patrón primario y el más alto de los terciarios, que pasaría a ser patrón secundario
- Debe obtenerse el índice de Gleason en cada cilindro por separado si las muestras se remiten individualizadas en frascos separados
- No hay consenso en cómo asignar el índice de Gleason si varios cilindros vienen incluidos todos en un mismo frasco .

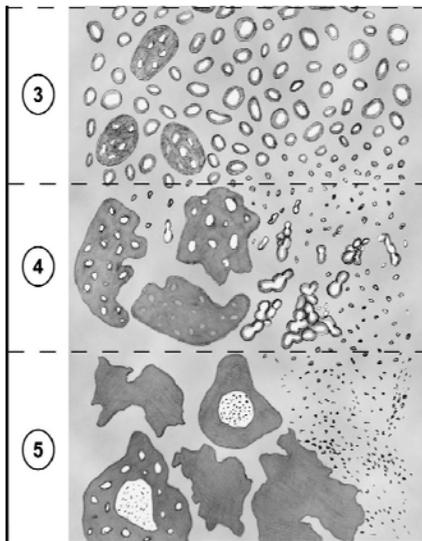


Figura 2: Gleason modificado 2005 para Biopsia

En el 2010 hay una nueva actualización del Gleason con pequeñas modificaciones al respecto⁵⁰:

- Se insiste en que no debería darse un diagnóstico de Gleason de 2-4 en biopsia.
- Algunos tumores (como aquellos con glándulas mal formadas) deberían clasificarse como grado 4.
- Todos los patrones cribriformes pasan a ser Gleason 4 y no 3.
- Se debe informar con cautela los patrones terciarios con gleason 4 y 5

6.3 Neoplasia intraepitelial de alto grado y atipia de pequeños acinos

Con la llegada de la era del PSA se han incrementado el número de BP realizadas y con ello no solo un aumento considerable en la incidencia del CaP sino también la aparición de nuevos diagnósticos patológicos como neoplasia intraepitelial de alto grado y lo que los autores anglosajones definen como ASAP (*atypical small acinar proliferation*) o atipia de pequeños acinos prostáticos, que nos plantean nuevas estrategias de seguimiento y manejo de los pacientes.

6.3.1 Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN)

Se define como acinos y conductos prostáticos arquitecturalmente benignos pero cubiertos por células atípicas. Estas células atípicas comparten cambios genéticos, morfológicos, histológicos e inmunohistoquímicos con el CaP, pero carecen de la invasión de la membrana basal. Es una lesión histológica existente en un 2,7 a 14,2% de las biopsias de próstata⁵¹. Tradicionalmente se ha considerado a esta lesión como un factor de riesgo para CaP y por ello la identificación de PIN de alto grado sin CaP concomitante era indicación de una rebiopsia inmediata. La tasa de detección de cáncer de próstata en la rebiopsia de HGPIN ha variado en el tiempo con una clara tendencia descendente, e incluso con evidencia en la actualidad de que un PIN de alto grado no supone un mayor riesgo de presentar CaP⁵²⁻⁵³.

6.3.2 Atipia de pequeños acinos prostáticos (ASAP)

Los focos de ASAP presentan algunos hallazgos patológicos similares a los del adenocarcinoma de próstata pero no son suficientes como para poder afirmar la existencia del mismo. Mientras que algunos pacientes son diagnosticados finalmente de carcinoma, otros presentan una amplia variedad de lesiones proliferativas benignas que se asemejan al carcinoma. La incidencia del ASAP es muy variable entre el 0,5% y el 18%⁵⁴. En las sucesivas biopsias se diagnosticó CaP en aproximadamente el 40% de los casos, por ello, todo paciente con un resultado de ASAP en la biopsia debe someterse a rebiopsia a los 3-6 meses siguientes⁵³.

6.4 Anatomía patológica de la pieza de prostatectomía

6.4.1 Gleason de la pieza

En el caso de la pieza de PR la graduación de Gleason presenta discretas diferencias. El consenso de 2005 aporta las siguientes modificaciones:

- Se ignora el patrón secundario de menor grado si es <5% del área tumoral
- No hay consenso sobre si incluir o no en el índice de Gleason cualquier patrón secundario de mayor grado si éste es <5% del área tumoral
- Tumores multifocales:□
 - Asignar índices independientes a cada nódulo
 - El índice más alto es el índice final
- No incluir el patrón terciario en el índice final, para evitar sobregradación del tumor

6.4.2 Estadio patológico (Tp)

El estadio patológico se obtiene tras en análisis histopatológico de la pieza de prostatectomía radical. A diferencia del clínico la T no incluye el T1²³ (Tabla 4).

Tabla 4: Clasificación TNM patológico.

TNM: Tumor primario – Anatomopatológico¹ (pT)	
pT2	Tumor confinado a la glándula prostática
pT2a	Tumor confinado a ≤ 50% de un lóbulo prostático
pT2b	Tumor confinado a > 50% de un solo lóbulo prostático
pT2c	Compromiso de ambos lóbulos prostáticos
pT3	Tumor con extensión extraprostática
pT3a	Tumor con extensión extraprostática o invasión microscópica del cuello vesical ²
pT3b	Tumor con invasión de vesículas seminales
pT4	Tumor con invasión del recto, músculos elevadores del ano y/o pared pelviana

¹No hay clasificación anatomopatológica T1.

²Los márgenes quirúrgicos positivos se deben indicar mediante un descriptor R1 (enfermedad residual microscópica)

6.4.3. Márgenes quirúrgicos

Se define margen quirúrgico positivo (MQP) en la pieza de PR a la extensión del tumor hasta la superficie externa de la pieza reseca, que se manifiesta en el examen microscópico por el contacto de las células tumorales con la superficie de la glándula pintada por el anatomopatólogo con tinta china. Hay diferentes formas de describir los márgenes, se pueden etiquetar como extensos o pequeños, multifocales o solitarios, de borde romo o espiculado o según su localización (ápex, base prostática, cara anterior o posterolateral).

La tasa media de márgenes positivos en las piezas de PR se sitúa en torno al 28%, con rangos que pueden oscilar entre el 0% y el 53%⁵⁵.

Las posibilidades de que aparezcan márgenes positivos se relacionan con el estadio clínico, el volumen tumoral, el porcentaje de tumor en la biopsia, el Gleason, la cifra de PSA preoperatorio, con el procesado anatomopatológico de la pieza o incluso con la experiencia del cirujano.

Estudios iniciales observaron que los pacientes con MQP tenían una mayor probabilidad de progresión bioquímica, por lo que eran pacientes candidatos a RT de rescate⁵⁶. Aunque de forma global el 50% de los pacientes con MQP presentan recidiva bioquímica (RBq) a los 5 años, no todos los márgenes positivos siguen la misma evolución. De hecho, estudios más recientes no encuentran que los MQP tras PR sean un factor de riesgo independiente para aparición de metástasis, CPRC o mortalidad cáncer de próstata específica (MCaPE). Por ello, hoy en día se recomienda que en ausencia de otros factores de riesgo, el MQP por sí solo no sea indicación de RT adyuvante, la cual debería posponerse hasta una elevación de PSA postoperatoria⁵⁷⁻⁵⁸.

6.4.4. Invasión perineural (IPN)

La invasión perineural (IPN) se considera una ruta metastásica en algunos tumores, y también se ha postulado en el CaP, sin embargo el mecanismo patogénico no se conoce con exactitud. Inicialmente se pensaba que había una diseminación desde el sistema linfático a los nervios, sin embargo, esta idea cambió cuando se evidenció que los canales linfáticos no penetran en el epineuro. Posteriormente, se presumía que era la vaina nerviosa la que tenía una baja resistencia, lo que favorecía la penetración tumoral⁵⁹. Recientemente se ha descubierto que el proceso de la IPN no es pasivo, sino que ocurre como consecuencia de una relación simbiótica entre las células tumorales malignas y el tejido nervioso. El microambiente de los

nervios aporta una ventaja para la supervivencia de las células prostáticas malignas, disminuyendo la actividad apoptótica y aumentando la actividad proliferativa comparado con el tejido prostático normal⁶⁰.

A pesar de que el proceso patológico de la IPN tenga importancia en la progresión del CaP en la actualidad no ha demostrado implicaciones pronósticas que abalen su utilidad clínica, por lo que se necesitan más estudios que expliquen la biología de este fenómeno.

7. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El tratamiento del CaP engloba diferentes opciones terapéuticas con una eficacia oncológica equivalente, lo que permite individualizar el tratamiento dependiendo de las características del paciente, la experiencia del cirujano y la disponibilidad de medios del centro de trabajo.

Las decisiones relativas al tratamiento en cada estadio clínico y grupo de riesgo de CaP deben basarse en las guías clínicas al respecto. Además, es importante contar con un equipo multidisciplinar bien coordinado, pues en determinados casos se pueden plantear estrategias de tratamiento multimodal de inicio, como es el caso de los pacientes con CaP de alto riesgo.

7.1 Tratamiento diferido

7.1.1 Actitud expectante (AE)

También conocido como tratamiento guiado por los síntomas, este término se acuñó en la era previa al cribado mediante PSA y hace referencia al tratamiento conservador del CaP hasta la aparición de progresión local o sistémica. Llegado este momento, se trata al paciente de forma paliativa mediante resección transuretral de la próstata (RTUP) u otros procedimientos para solucionar la obstrucción de orina, así como con hormonoterapia (HT) o radioterapia (RT) para el tratamiento paliativo de las metástasis.

Puede recomendarse para pacientes que no asumen los efectos nocivos del tratamiento activo, particularmente aquellos con un esperanza de vida inferior a 10 años.

7.1.2 Vigilancia activa (VA)

También conocido como seguimiento activo, actualmente considerado dentro del esquema de tratamiento conservador del CaP. Introducido en el último decenio, incluye la decisión activa de no tratar inmediatamente al paciente sino someterle a seguimiento con vigilancia estrecha, así como de tratarle al alcanzar unos umbrales predefinidos que determinan la progresión (es decir, tiempo breve de duplicación del PSA y deterioro de los factores histopatológicos en las biopsias de repetición). En estos casos, las opciones terapéuticas pretenden ser curativas.

Hoy en día las guía clínicas recomiendan la VA en aquellos CaP de bajo riesgo, es decir, estadios T1c-T2a, PSA < 10 ng/mL y gleason de la biopsia $\leq 6^G$.

El seguimiento se basará en TR, PSA y repetición de biopsia, sin que existan esquemas claros al respecto. En aquellos casos en los que haya una progresión del gleason en la biopsia, se debe recomendar al paciente el tratamiento activo.

A continuación se muestran las diferencias entre ambas modalidades de tratamiento diferido (Tabla 5).

Tabla 5: Diferencias entre vigilancia activa y actitud expectante.

	Vigilancia Activa	Actitud expectante
Intención de tratamiento	Curativa	Paliativa
Seguimiento	Esquema predeterminado	Específico para cada paciente
Marcadores	TR, PSA, rebiopsia, RM opcional	No predefinido
Expectativa de vida	> 10 años	< 10 años
Objetivos	Minimizar toxicidad del tratamiento sin disminuir supervivencia	Minimizar toxicidad del tratamiento
Comentarios	Solo para pacientes de bajo riesgo	Se puede indicar en todos los estadios

7.2 Prostatectomía radical

La PR según las Guías Europeas de Urología es uno de los estándares de tratamiento en CaP de bajo riesgo y riesgo intermedio en pacientes con una esperanza de vida superior a los 10 años⁶².

Se plantea como tratamiento opcional en el CaP localizado de alto riesgo en el contexto de un tratamiento multimodal, en el que tras la cirugía radical normalmente se sigue la RT⁶³.

En los casos con riesgo intermedio y alto se debe asociar una linfadenectomía ampliada. En el caso de obtener más de dos ganglios afectados, las recomendaciones son el tratamiento hormonal tras la cirugía y en el caso de dos o menos nódulos ganglionares afectados se puede hacer vigilancia⁶⁴.

7.3 Radioterapia

7.3.1 Radioterapia externa

En la actualidad no existen estudios aleatorizados en los que se compare la RT con otras modalidades de tratamiento como la PR o la VA, por eso siguen vigentes las recomendaciones del *National Institute of Health* del 1988 que concluyen que la RT obtiene los mismos resultados en cuanto a supervivencia a largo plazo que la cirugía⁶⁵.

Existen diferentes modalidades de RT, y la más recomendada hoy en día es la RT externa de intensidad modulada (IMRT), puesto que consigue altas tasas de eficacia con menor toxicidad⁶⁶.

Podemos indicar la RT en aquellos pacientes con CaP localizado, independientemente del grupo de riesgo. Hay que especificar que en aquellos pacientes de riesgo intermedio se debe combinar la RT con la hormonoterapia durante 4-6 meses. En caso de pacientes de alto riesgo y/o CaP localmente avanzado (T3-T4) se recomienda seguir durante 2-3 años la pauta de bloqueo hormonal.

7.3.2 Braquiterapia

La braquiterapia es una modalidad de la RT y consiste en la colocación de fuentes radioactivas en la glándula prostática mediante el implante de semillas radioactivas. Dado su

corto rango de irradiación emitido, se pueden liberar altas dosis de energía de forma más selectiva, evitando toxicidad en órganos vecinos. Se recomienda de forma opcional para pacientes con CaP localizado de bajo riesgo, con volúmenes prostáticos por debajo de 50 mL y escasa sintomatología miccional, sin RTUP previa⁶⁷.

7.4 Hormonoterapia

La hormonoterapia (HT) consiste en el bloqueo hormonal androgénico, el cual puede llevarse a cabo de diferentes formas. Hoy en día las maniobras hormonales disponibles son: la orquiectomía subalbugínea, los agonistas de la hormona liberadora de luteotropina humana (LHRH), Dietilbestrol (DES)⁶⁸, antagonistas de la LHRH⁶⁹ y los antiandrógenos⁷⁰.

La HT como tratamiento de inicio no está recomendada en el CaP localizado. Queda reservado para pacientes con tumores localizados sintomáticos o asintomáticos, con PSADT < 12 meses y PSA > 50, con tumores pobremente diferenciados que no desean recibir un tratamiento con intención curativa. Sí que tiene una indicación más clara en el caso de pacientes metastásicos⁷¹:

- Si son sintomáticos: con el objetivo de paliar síntomas y reducir el riesgo de secuelas derivadas de la enfermedad avanzada (compresión medular, fracturas patológicas, obstrucción uretral, metástasis extraóseas)
- En el caso de pacientes metastásicos asintomáticos: para retrasar la progresión a un estadio sintomático y evitar complicaciones graves asociadas.

7.5 Otras alternativas

Además de PR, la RT y la HT existen otras modalidades emergentes de tratamiento para el CaP localizado como son los ultrasonidos focalizados de alta intensidad (UFAI)⁷², la crioterapia⁷³ o la terapia focal⁷⁴. Han demostrado buen efecto terapéutico en el CaP de bajo riesgo, sin embargo se necesitan estudios prospectivos randomizados para hacer recomendaciones al respecto⁷⁵⁻⁷⁸.

8. SEGUIMIENTO

El seguimiento a realizar va a variar dependiendo de la situación clínica del paciente, pues no es lo mismo un seguimiento en un CaP localizado que se ha tratado con intención curativa que un CaP metastásico. El PSA y el TR son las dos pruebas que hay que realizar de forma sistemática en todos los casos y el resto de exploraciones complementarias se deben individualizar.

Hasta la fecha el único marcador de seguimiento del que disponemos es el PSA, y es el que se utiliza para monitorización la enfermedad así como predecir un fracaso en el tratamiento. Una elevación del mismo puede implicar una recidiva, conocida como bioquímica (RBq), que precede a la recidiva clínica (RCl).

8.1 Concepto de recidiva bioquímica

La definición de RBq es diferente dependiendo de la modalidad terapéutica empleada, de forma que:

- Tras una PR los valores de PSA deben mantenerse en 0. Dos valores consecutivos de 0,2 ng/mL o más representan una RBq⁷⁹.
- Tras la conferencia de la RTOG-ASTRO del 2006 se propuso una nueva definición de RBq tras RT, consistente en un aumento de 2 ng/mL por encima del PSA nadir (PSAn)(valor mínimo alcanzado tras el tratamiento)⁸⁰.
- En el caso de las nuevas terapias en desarrollo como la crioterapia o la UFAI, no existe un consenso claro de cuándo se considera RBq⁸¹.

8.2 Esquema de seguimiento

En la mayoría de pacientes en los que se produce un fracaso de tratamiento, éste aparece de forma temprana, es por ello que tras un tratamiento con intención curativa el seguimiento inicial, en los primeros años, debe ser más estrecho.

Se recomienda realizar una determinación de PSA y TR a los 3,6,12 meses después del tratamiento, después semestralmente hasta los 3 años y posteriormente de forma anual. Ante la sospecha de una RBq o RCl podemos ampliar el estudio con otras pruebas complementarias⁶²:

- ETR y biopsia: el objetivo es valorar una recidiva local. Sólo debe realizarse cuando el resultado de la misma vaya a influir en la decisión terapéutica.
- TC/RM: No tienen cabida en el seguimiento habitual de los pacientes asintomáticos. Puede utilizarse selectivamente en la evaluación de la RBq antes de toma decisiones terapéuticas.
- Gammagrafía ósea: la finalidad es detectar metástasis óseas. No se recomienda en el seguimiento sistemático, sino en aquellos pacientes con síntomas óseos o con cifras de PSA elevadas.

En el caso de los pacientes con CaP metastásico que llevan tratamiento hormonal de forma prolongada, el seguimiento difiere, no sólo por el pronóstico de la enfermedad sino también por las posibles complicaciones derivadas del tratamiento de deprivación androgénica. Se debe realizar, además de la determinación del PSA y el TR, una determinación de testosterona, hemoglobina, creatinina sérica y la fosfatasa alcalina. Aquellos pacientes que están recibiendo deprivación androgénica deben tener niveles séricos de castración de testosterona. Clásicamente se hablaba de castración cuando la testosterona estaba por debajo de 50 ng/dL, sin embargo, con la mejora de la sensibilidad de detección de niveles de testosterona, se acepta que este valor sea 20 ng/dL⁸². Recientemente, el grupo de Morote publicó un estudio en el que replanteaban el punto de corte de la testosterona estableciéndolo en 32 ng/dL⁸³.

Las pruebas de imagen se reservan para aquellos casos en los que se sospechen metástasis a distancia.

Inicialmente el seguimiento en el CaP metastásico debe hacerse cada 3-6 meses, y en aquellos casos de buena respuesta al tratamiento (PSA < 4ng/mL), podremos establecer un régimen de visitas semestral.

9. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Los factores pronósticos son aquellas características de una enfermedad que pueden predecir la evolución de la misma en un individuo determinado. La alta incidencia del CaP y su heterogeneidad, hacen importante el establecer el riesgo de progresión y distinguir aquellos tumores que no van a progresar de aquellos que pueden ser letales.

Se han considerado diferentes características clínicas y patológicas como factores pronósticos en el CaP y los que más establecidos hasta la fecha son el PSA sérico pretratamiento, el estadio TNM clínico y patológico, el grado histológico de Gleason y los MQP⁴². Se han desarrollado nomogramas que incluyen estos parámetros para predecir la RBq tras PR⁸⁴⁻⁸⁵.

- PSA: El PSA es uno de los factores con mayor potencial pronóstico, tanto el preoperatorio como el PSA tras tratamiento. En pacientes con BP positiva para CaP que presentan elevación de PSA, éste es un factor de riesgo independiente de EEC, MQP y afectación glandular⁸⁶. El PSA_v y el PSADT también pueden tener un papel en el pronóstico de pacientes tratados con CaP⁸⁷.
- Gleason Score: Es el factor pronóstico del comportamiento clínico y respuesta al tratamiento más fuerte para el CaP. De hecho se ha incorporado a todos los nomogramas que predicen la supervivencia cáncer específica (SVCaPE) tras PR¹¹. Los pacientes con Gleason > o igual a 7 tienen un mayor riesgo de EEC, recurrencia y muerte cáncer específica (MCAPE). Sin embargo, aquellos con Gleason 6 tienen un bajo riesgo de MCAPE. Además, algunos estudios muestran que existen diferencias en cuanto a pronóstico dentro del Gleason 7 dependiendo de si el patrón principal es 4 ó 3 (4+3 ó 3+4), teniendo un riesgo multiplicado por tres de MCAPE en aquellos casos de Gleason 4+3⁸⁸.
- Estadio tumoral: La utilidad del estadiaje clínico como parador pronóstico aumenta cuando se asocia con PSA y el Gleason¹¹.
- Márgenes quirúrgicos positivos: son un factor de riesgo independiente de RBq. La descripción patológica del mismo es importante puesto que la mayor o menor extensión del borde afecto también se ha relacionado con el pronóstico⁸⁹.
- Invasión perineural: la presencia de células tumorales en los nervios, tiene una relevancia pronóstica puesto que es un posible mecanismo de EEC. Numerosos estudios han evaluado el papel pronóstico de la IPN⁹⁰ en biopsia, encontrando que sí puede predecir mayor número de recidivas. Sin embargo, no se ha encontrado asociación pronóstica a la IPN de la pieza de PR⁹¹⁻⁹².
- Grupos de riesgo: además de los factores de forma individualizada, la combinación de éstos representa una herramienta más potente en cuanto a la predicción pronóstica. Cuando los combinamos las características patológicas adquieren mayor potencia estadística, y es por ello que hoy en día existen clasificaciones de riesgo⁹³, y

nomogramas⁸⁴ que aglutinan diferentes variables para establecer el pronóstico de la enfermedad previa a decidir el tratamiento adecuado.

Son numerosos los estudios que han salido a la luz en los últimos años que buscan establecer nuevos marcadores pronósticos a nivel molecular, de forma que puedan ser incluidos en los nomogramas utilizados hasta ahora. A pesar de que se han hallado datos esperanzadores, todavía es necesario más tiempo para que estén al alcance la práctica clínica⁹⁴⁻⁹⁸.

10. CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN (CPRC)

El CPRC se define actualmente como aquel CaP que presenta:

- Tres elevaciones consecutivas de PSA, separadas por al menos una semana, con dos incrementos del 50% sobre el nadir y siempre que este incremento de lugar a un PSA mayor de 2 ng/ml.
- Niveles de testosterona de castración.
- Progresión de lesiones óseas ≥ 2 en gammagrafía ósea o progresión de lesiones de tejidos blandos según los criterios RECIST (*Response evaluation criteria in solid tumors*) (Anexo 1).

A pesar de que el tratamiento de deprivación androgénica inicialmente es una opción terapéutica efectiva, en la evolución de la enfermedad puede desembocar en un estadio de resistencia a la castración, como consecuencia de una reactivación aberrante del RA. Adicionalmente, se ha observado en diferentes estudios que también intervienen otras moléculas, como los factores de transcripción, oncogenes y los supresores tumorales que pueden perturbar y llevar a el inicio de la progresión tumoral y a la enfermedad incurable.

Todavía no se sabe con certeza las vías que llevan al CPRC, siendo las más estudiadas aquellas en las que se ve implicado el RA. Sin embargo, se han sugerido diferentes mecanismos independientes al RA por los cuales las células tumorales se adaptan al ambiente hostil que la deprivación androgénica supone para ellas.

Hoy en día existen diferentes opciones terapéuticas para los pacientes que entran en CPRC, entre los que se encuentran:

- Acetato de Abiraterona: bloquea el complejo Citocromo p450 (CYP17) inhibiendo la producción de andrógenos a todos los niveles (testicular, suprarrenal e intratumoral). Aprobado su uso en la actualidad para el tratamiento de CPRC pre y postquimioterapia⁹⁹.
- Enzalutamida: es un inhibidor potente de la señalización de los receptores androgénicos que bloquea los tres pasos fundamentales en la vía de señalización de los RA. Inhibe de manera competitiva la unión de los andrógenos al RA, la translocación nuclear de los receptores activados e inhibe la asociación del RA con el ADN, incluso en situación de sobreexpresión de RA.
- Quimioterapia: Docetaxel o Cabazitaxel
- Nuevos fármacos, todavía en estudio:
 - o Inhibidores de la síntesis de andrógenos: Oretrolon (TAK 700)
 - o Antiangiogénicos: Tasquinimod, Cabozantinib
 - o Inhibidores de la respuesta al estrés: Custirsén (OGX-011)
 - o Inmunoterapia: Sipuleucel T, PROSTVAC
 - o Radiofármacos: Cloruro de radio-223 (Alpharadin)

11. NUEVOS MARCADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA

El diagnóstico del CaP se basa hoy en día en el examen histopatológico de la BP, un procedimiento invasivo y no exento de morbilidad. La selección de pacientes que deben ir a biopsia sigue dependiendo del valor de PSA y del TR. De hecho, el PSA es el único biomarcador para cáncer de próstata utilizado en la práctica clínica habitual. Además, el PSA es un marcador con baja especificidad, lo que lleva a un elevado número de biopsias negativas.

El amplio uso del PSA en las últimas décadas ha llevado al diagnóstico de tumores prostáticos clínicamente insignificantes, y como resultado, a un sobretratamiento de estos tumores. Es por ello que surge la necesidad de identificar nuevas herramientas que puedan ayudarnos a diferenciar entre tumores indolentes de aquellos que son clínicamente significantes.

La tendencia actual es la búsqueda de marcadores moleculares, y en este campo ha habido numerosos progresos en los últimos años, con novedades como el gen del antígeno 3 (PCA3), el 2-pro-PSA, los factores de crecimiento, técnicas de inmunohistoquímica, las células circulantes, los genes de fusión, la epigenética, los perfiles proteómicos o los microARNs¹⁰⁰.

Dado que el CaP es una entidad muy heterogénea, ninguna hasta la fecha ha conseguido por sí sola aportar suficiente rendimiento, de forma que lo ideal sería poder establecer una batería de múltiples marcadores que permitiera definir el perfil oncológico de cada paciente, sirviendo como herramienta para toma de decisiones terapéuticas, aportando información sobre el pronóstico y utilizándose como método de monitorización tras el diagnóstico de CaP.

Algunos de estos marcadores ya se utilizan en la actualidad, pero todavía no están incluidos en las guías clínicas. En el presente estudio vamos a profundizar en nuestros resultados relativos a los genes de fusión, las técnicas de inmunohistoquímica así como los marcadores epigenéticos.

11.1 Marcadores inmunohistoquímicos en el cáncer de próstata

La inmunohistoquímica puede resultar un método de diagnóstico complementario del CaP. Actualmente ya se utilizan en la práctica habitual del laboratorio de anatomía patológica algunos anticuerpos para el estudio de focos limitados de carcinoma de próstata, como algunas citoqueratinas, el P63 y la α -metil-acilcoA racemasa¹⁰¹.

Se están estudiando otros marcadores inmunohistoquímicos relacionados con la proliferación celular y la apoptosis en el CaP, que también pudieran tener implicación en la etiopatogenia de la neoplasia prostática.

El disponer un kit de marcadores de inmunohistoquímica puede contribuir a las mejoras en el diagnóstico y descripción del perfil del paciente con CaP.

11.1.1 Fosfatasa ácida prostática

La FAP humana es una glicoproteína de 100 kDa que es sintetizada por las células epiteliales de la glándula prostática. Como su nombre indica la FAP muestra una actividad fosfatasa en condiciones de acidez (pH entre 4-6). La actividad enzimática de esta proteína ocurre cuando la FAP forma un homodímero tras la unión de dos subunidades catalíticas inactivas de 50 kDa. Su función es defosforilar macromoléculas y se cree que puede tener un papel regulador del crecimiento celular prostático, sin embargo, no se conoce con detalle el mecanismo molecular por el que actúa¹⁰².

Se ha observado que no sólo la próstata expresa FAP, sino que también podemos encontrarla en otros tejidos tales como la mama tumoral, las glándulas salivares, el ovario, páncreas, colon y piel¹⁰³.

En humanos la FAP es una de las proteínas que se secretan en mayor cantidad por el epitelio prostático a partir de la pubertad. Sus niveles se encuentran cercanos a 0,5 mg/ por gramo de tejido prostático y 1 mg/mL en el líquido seminal¹⁰³. En individuos sanos los niveles séricos se encuentran entre 1-3 ng/mL, mientras que en pacientes con CaP y más si es metastático, son más elevados¹⁰⁴. A pesar de que los niveles séricos de FAP pueden aumentar en la próstata tumoral, los niveles intracelulares y la actividad de esta proteína están disminuidos en las células cancerosas. Esta discrepancia se explica porque existen dos formas de FAP en las células epiteliales prostáticas: la forma celular (FAPc) y la forma sérica (FAPs). Ambas difieren en sus propiedades bioquímicas, como la hidrofobicidad, puntos de isoelectricidad y patrones de glicosilación. La disminución en las células tumorales prostáticas es debida a una hiperfosforilación de HER-2 en los residuos de tirosina y una activación de la vía ERK/MAPK (extracelular signal-reguated kinase/mitogen activated protein kinase), que puede llevar al crecimiento celular en condiciones de independencia androgénica y al desarrollo tumoral¹⁰⁵.

Los niveles séricos de FAP aumentan de forma proporcional a la progresión del cáncer de próstata, de hecho, previo a la era del PSA, la FAP se utilizaba como marcador en el CaP. Posteriormente, el PSA desplazó a la FAP por su mayor especificidad y capacidad de detección precoz del CaP¹⁰⁶. Hoy en día hay un interés renovado en esta enzima por su posible utilidad pronóstica y por su éxito en la inmunoterapia para el CaP.

Diferentes trabajos han identificado la FAP como una factor pronóstico para aquellos pacientes con un CaP de riesgo intermedio o alto. Es especialmente útil en predecir la recurrencia a distancia en los pacientes de alto riesgo¹⁰⁷.

Además, la especificidad de la expresión de FAP en la próstata, aunque no es absoluta, hace que se pueda utilizar como vacuna en el CaP. Recientemente se ha aprobado el uso del Sipuleucel-T, el cual tiene como diana la FAP. Ha demostrado un aumento de la supervivencia en pacientes con CPRC metastático mínimamente sintomáticos o asintomáticos con escasa inmunotoxicidad¹⁰⁸.

11.1.2 PSA

El antígeno prostático específico es uno de los marcadores prostáticos por excelencia, ya que se expresa selectivamente en el epitelio acinar y ductal prostático. Tiene escasa utilidad en el diagnóstico inmunohistoquímico de forma rutinaria, utilizándose en aquellos casos en los que morfológicamente pueden existir dudas respecto al origen prostático. Por ejemplo, puede solicitarse en aquellos casos en los que queramos establecer el origen prostático de una metástasis por adenocarcinoma. También podemos utilizar el diagnóstico inmunohistoquímico del PSA cuando queremos diferenciar el epitelio de las vesículas seminales del prostático en las muestras de BP. También en aquellos casos en los que no sabemos con seguridad si se trata de un tumor de origen prostático, de recto, urotelial, un adenoma mesonéfrico, etc¹⁰⁹. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las muestras de CaP pobremente diferenciado resultan negativos para PSA en el 27% de los casos. Por otra parte, no se ha observado correlación entre la intensidad de inmunotinción y distribución de PSA con el grado de diferenciación histológica ni con la respuesta al tratamiento¹¹⁰.

11.1.3 Racemasa (P504S)

Uno de los marcadores más utilizados en la práctica habitual por el uropatólogo y que ha representado un avance en el diagnóstico anatomopatológico del CaP ha sido el α -Methylacyl Coa Racemasa (AMACR o P504S). La proteína P504S fue descrita originalmente en células hepáticas humanas localizada en peroxisomas y mitocondrias. Esta proteína juega un papel básico en la beta-oxidación de las cadenas ramificadas de ácidos grasos, catalizando la conversión de (2R) α -methyl acyl CoAs cadena ramificada grasa hacia sus (S) esteroisómeros¹¹¹.

Xu y cols. en el año 2000 y utilizando análisis de microarrays de ADNc en próstata identificaron tres proteínas: P503S, P504S y P510S¹¹². Estudios posteriores usando microarrays de ADNc, *Northern blot* y qPCR demostraron que la proteína P503 se expresaba en adenocarcinoma y tejido prostático benigno, en contraste con la proteína P504S que selectivamente se sobreexpresaba en el CaP con mínima o ninguna expresión en tejido normal o hiperplásico¹¹³.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína AMACR, se observó una alta expresión difusa en más del 75% de glándulas

prostáticas malignas y una ausencia de expresión en tejido prostático benigno de la zona periférica y de hiperplasia glandular de la zona transicional¹¹⁴. Estos resultados han sido ratificados por otros estudios en los que utilizando un anticuerpo policlonal para AMACR en BP obtienen una alta expresión en el CaP, independiente del grado histológico de Gleason, con una sensibilidad del 82-100% y una especificidad del 79-100%. En estos trabajos, se ha observado que en más del 95% de biopsias con CaP existe una intensa inmunoexpresión para AMACR en contraposición con una leve inmunoexpresión en menos del 4% de tejidos histológicamente benignos¹¹⁵⁻¹¹⁶. Otros autores también han observado una intensa inmunoexpresión de AMACR en los adenocarcinomas incidentales de zona transicional en muestras procedentes de material de RTU o de piezas de adenomectomías por HBP¹¹⁷.

En algunas variantes poco frecuentes como el adenocarcinoma pseudohiperplásico, el adenocarcinoma atrófico y el adenocarcinoma espumoso (o *foamy cell carcinoma*) se ha observado asimismo inmunoexpresión para AMACR en el 62 a 77% de los casos. Por último, en los menos frecuentes adenocarcinomas ductales también se ha detectado inmunoexpresión para P504S, en el 100% de los casos¹¹⁸.

En los cortes histológicos la inmunoexpresión para AMACR en las glándulas neoplásicas es de tipo granular e intenso citoplasmático, con un característico refuerzo apical. Este tipo de expresión es fácilmente detectable a bajo aumento (menos de 100X) y típico en las glándulas neoplásicas, y no en glándulas benignas que raramente presentan expresión. En estos infrecuentes casos la inmunotinción suele ser focal, leve y sin refuerzo circunferencial en epitelios y ausente en estroma periglandular prostático. En el caso del HGPIN se ha demostrado una inmunotinción moderada a intensa para AMACR en más del 64% de casos¹¹⁹.

El punto más interesante para el uropatólogo es la aplicación de este marcador en el diagnóstico de mínimos focos de adenocarcinoma prostático (adenocarcinoma de menos de 1mm. o afectación de <5% en un solo cilindro de la biopsia) y en los ASAP¹²⁰. Así, diferentes trabajos al respecto con series amplias de pacientes han demostrado una sensibilidad para AMACR del 88% en mínimos focos de adenocarcinoma afectando < 5% solo en uno de los cilindros¹²¹⁻¹²².

La inmunohistoquímica con P540S también parece ser una herramienta útil en la identificación de nidos tumorales residuales post-tratamiento anti-androgénico ya que las

glándulas benignas con atipia reactiva no observan sobreexpresión para esta proteína^{118,123}. Por otra parte, el tratamiento radioterápico no parece tener tampoco impacto sobre la inmunoexpresión de AMACR ya que en nidos neoplásicos residuales, con morfología dificultosa tras tratamiento, se sigue observando sobreexpresión para P504S¹²⁴⁻¹²⁵.

Actualmente existe para P504S o AMACR un anticuerpo policlonal ya comercializado y ampliamente introducido en los laboratorios de anatomía patológica para la práctica uropatológica diaria, siendo extremadamente útil en los casos dudosos.

11.1.4 Receptor androgénico

Los andrógenos son esenciales para el crecimiento y desarrollo prostático. Desde que Huggings y colaboradores¹²⁶ establecieron la dependencia androgénica del CaP, la terapia de ablación (en sus diferentes modalidades) ha sido uno de los pilares más importantes en el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, sabemos que la respuesta a este tratamiento no es indefinida, sino que con el tiempo muchos de estos tumores pasan a ser hormonosistentes. Este fenómeno podría explicarse por la presencia de clones celulares insensibles a la acción androgénica, y que seguirían proliferando sin control a pesar del tratamiento, o por la alteración del receptor de andrógenos (RA)¹²⁷.

El gen que codifica el RA se encuentra localizado en el cromosoma X en la posición Xq11-12¹²⁸. Dicho gen codifica una proteína de 919 aminoácidos y un peso molecular de 98 kDa perteneciente a la superfamilia de receptores esteroideos de localización nuclear¹²⁹ y que se compone de tres dominios: un dominio de activación transcripcional, otro de unión al ADN y otro de unión a andrógenos situado en la porción C-terminal. Su activación provocará la transcripción de los genes regulados por los andrógenos¹³⁰.

El RA facilita la regulación de genes implicados en la proliferación y diferenciación prostática. Mutaciones que sean capaces de alterar su estructura, función y regulación pueden favorecer el crecimiento de subpoblaciones celulares dentro del tumor capaces de proliferar incluso en un medio privado de andrógenos¹³¹.

El RA se encuentra presente en el CaP tanto primario como metastásico independientemente del grado o estadio, así como en los tumores hormonorefractarios¹³²⁻¹³³. Su activación en las células prostáticas normales y neoplásicas promueve fenómenos de

proliferación y angiogénesis complejos, implicados en la progresión del tumor y eventualmente en el desarrollo de la independencia hormonal.

En resumen, los andrógenos actuando a través del RA, están implicados en la carcinogénesis prostática, comportándose como promotores de la proliferación celular tumoral.

11.1.5 ERG

La proteína ERG es el producto de la fusión entre el gen *TMPRSS2* y *ERG* como se detallará más adelante, el cual es el reordenamiento génico más prevalente en el CaP, con una frecuencia aproximada del 50%¹³⁴. El resultado de esta fusión es la sobreexpresión de un producto proteico ERG truncado, el cual aparece en el 60-70% de los pacientes con CaP¹³⁵. La prevalencia de la sobreexpresión de ERG ha llevado al desarrollo de técnicas de detección de esta proteína, de forma que resulte más sencillo que las utilizadas hasta ahora, como la PCR o el FISH. Hoy en día se dispone de un anticuerpo monoclonal específico ya comercializado frente a esta proteína de fusión que permite la detección de ERG. Los diferentes estudios al respecto muestran que existe una buena concordancia entre la expresión proteica de ERG con el reordenamiento genético en el CaP, de ahí la utilidad de este método en el diagnóstico de la presencia de la fusión¹³⁶⁻¹³⁹.

11.1.6 Beta-catenina

La β -catenina es una proteína de función dual, actúa por una parte regulando la adhesión celular y por otra parte interfiere en la transcripción de genes, actuando como un transductor de señal intracelular en la vía de señalización de Wnt (Figura 3).

La vía Wnt necesita a la β -catenina para llevar a cabo su función en el interior del núcleo afectando a la expresión génica. La vía de señalización Wnt- β -catenina juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular, por lo que es fácil entender que su alteración afecte numerosas anomalías del desarrollo, crecimiento y homeostasis. El sistema Wnt se une a unos receptores de membrana de la familia *Fri~~z~~led* (*FR~~z~~*) y LRP. La activación de señales iniciadas por Wnt conduce a la inactivación de GSK3B,

el complejo β -catenina no se fosforila y la β -catenina se acumula en el citosol migrando al núcleo, donde se une a factores de transcripción para regular la expresión génica.

Esta señal en el núcleo está implicada en la regulación del destino celular durante el desarrollo embrionario, y una incorrecta activación de la transcripción de la β -catenina puede contribuir a la progresión del cáncer, causando incremento en la proliferación. Esta desregulación en las señales mediadas por Wnt pueden estar implicadas en la formación de tumores.

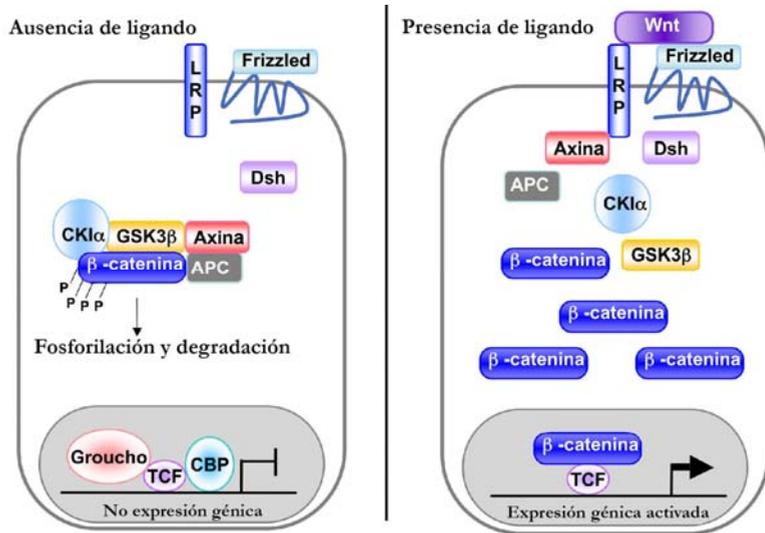


Figura 3: Vía señalización Wnt.

Se han observado niveles elevados de β -catenina en diferentes neoplasias, como el carcinoma de células basales, el carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, el cáncer colorrectal, pilomatrixoma, el meduloblastoma, el cáncer de ovario y CaP.

La señalización de la β -catenina a nivel nuclear ha sido ampliamente implicada como un oncogen y en el caso del CaP se cree que la sobreexpresión de esta proteína es causada por el exceso de señalización de Wnt¹⁴⁰, estando relacionada con la señalización de múltiples vías, formando parte en muchas de ellas el receptor androgénico¹⁴¹.

11.1.7 PSMA

El PSMA es una glicoproteína transmembrana tipo 2 que se expresa de forma predominante en el epitelio prostático. Se ha observado una elevación significativa de este marcador en los paciente con CaP, particularmente en aquellos casos más indiferenciados, metastásicos y resistentes a la castración¹⁴². Múltiples estudios sugieren que el PSMA se correlaciona bien con el Gleason y el estadio de la enfermedad, así como que es un marcador que puede utilizarse para la monitorización de la progresión de la enfermedad tras el tratamiento¹⁴³⁻¹⁴⁶. El PSMA también se ha mostrado como un marcador prometedor por su sensibilidad a la hora de detectar micrometástasis en nódulos ganglionares que no son detectables por microscopía¹⁴⁷. El PSMA también se ha utilizado para realización de escintigrafías, localizando las células cancerígenas del tumor prostático marcando el PSMA con un anticuerpo monoclonal marcado con Indio^{111, 148}. Se ha utilizado para evaluar metástasis en tejidos blandos de forma preoperatoria en pacientes con diagnóstico de CaP de alto riesgo. Podría ser un marcador de utilidad para la evaluación de recurrencia bioquímica tras tratamiento local.

11.1.8 p53

El gen p53 es un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17. Codifica una proteína nuclear de 53 kDa. La función de p53 en condiciones normales es la de regulación del ciclo celular ante un daño del ADN. En estos casos, la proteína p53 se acumula en el núcleo y es capaz de detener el ciclo celular antes de que se duplique el ADN e iniciar así su reparación. Además, la p53 induce la síntesis de proteínas inhibitoras de los complejos ciclina-CDKs, bloqueando el ciclo celular. Si se repara la lesión, el ciclo continúa, pero si no se repara, se induce la apoptosis de la célula mediante la expresión de genes como bax. La alteración de la proteína p53 produce inestabilidad genómica, siendo las células incapaces de evitar la proliferación o activar la apoptosis cuando está comprometida la integridad del ADN, de manera que son capaces de acumular mutaciones que pueden llevar a la carcinogénesis¹⁴⁹.

Las mutaciones del p53 aparecen en aproximadamente la mitad de los tumores y son fundamentalmente debidas a mutaciones por sustitución, de manera que se cambia un aminoácido por otro. Se ha observado que las mutaciones del gen p53 y su acúmulo se asocian

con fenotipos más agresivos en muchos cánceres, incluyendo el de mama, pulmón y colorectal¹⁵⁰.

La pérdida de función de p53 también puede ser debida a deleciones como ocurre en los sarcomas, o bien por inactivación de la proteína como observamos en el carcinoma de cérvix, donde los virus del papiloma humano (VPH) 16 y 18 producen la proteína E6, que promueve la proteólisis de p53, perdiéndose la función de la misma¹⁵¹.

En el caso del CaP, diferentes estudios han mostrado una asociación entre el acúmulo nuclear de p53 y una pobre diferenciación, progresión, metástasis y crecimiento andrógeno independiente¹⁵²⁻¹⁵³. Se considera una expresión anómala cuando hay $> 0 = 20\%$ de tinción nuclear¹⁵⁴.

En un estudio en el que se incluyen pacientes con CaP localmente avanzado se encontró una asociación entre el p53 y la progresión metastásica y la MCAPE¹⁵⁴. En otro trabajo más reciente, en el que se incluían pacientes con CaP localizado también la expresión de p53 era un factor asociado a la MCAPE¹⁵⁵.

También se ha utilizado el p53 para el tratamiento del cáncer, mediante terapia génica. Lo que se pretende con este tratamiento es la restauración de la función del p53 en los tumores que presentan alteración del mismo. En estos casos el objetivo es detener el crecimiento tumoral mediante la inducción de una apoptosis masiva¹⁵⁶.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la restauración del p53 en el CaP con vectores adenovirales puede aumentar la radiosensibilidad¹⁵⁷. Hay estudios que muestran que aquellos pacientes con CaP y acumulación de p53 a los que se les indica RT tienen una mayor riesgo de recidiva bioquímica¹⁵⁸.

No obstante son necesarios más estudios para determinar el valor pronóstico del p53, así como establecer la relación existente entre el estatus del p53, la deprivación androgénica y la RT.

11.1.9 Topoisomerasa-II α

La topoisomerasa-II α o girasa es un heterodímero (dos monómeros diferentes), codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. Es una enzima involucrada en la replicación, transcripción, recombinación del ADN y remodelación de la cromatina¹⁵⁹. Es capaz de cortar las dos hebras de ADN, uniéndose por una subunidad catalítica a los enlaces 5'P. La topoisomerasa-II α acepta ADN superenrollado positiva y negativamente y relajado. Actúa de manera conjunta para mantener el nivel adecuado de superenrollamiento para que se lleven a

cabo los procesos biológicos. Por su importante papel en la síntesis y transcripción del ADN y también se ha implicado en gran variedad de cánceres en humanos¹⁶⁰.

La expresión elevada de topoisomerasa-II α se ha relacionado con la recurrencia o progresión del CaP, correlacionándose con el Gleason, la metástasis y un peor pronóstico. De esta manera se postula como un posible marcador pronóstico en el CaP¹⁶¹.

11.1.10 E- cadherina

Las cadherinas son una familia multigénica de glicoproteínas de adhesión que proporcionan el mantenimiento de las uniones célula-célula y participan como mediadores en la migración celular¹⁶².

La pérdida de expresión de estas moléculas se ha asociado al fenotipo invasivo tumoral precisamente por su papel en la adhesión celular¹⁶³, siendo consideradas en la actualidad como moléculas supresoras de la invasión¹⁶⁴.

Dentro de esta familia destaca la E-Cadherina, una molécula de adhesión calcio-dependiente encargada del mantenimiento de la capa epitelial de los tejidos. A medida que un tumor adquiere capacidad para invadir, progresar y metastatizar, la expresión de E-Cadherina se va perdiendo¹⁶². Para que se de la metástasis se requiere la pérdida de la adhesión celular, y aquí es donde interfiere la E-cadherina, haciendo que las células tengan capacidad migratoria. Se ha observado asociación entre la pérdida de su expresión y grados indiferenciados y estadios avanzados de CaP, por lo que puede ser otro marcador clave en pronóstico del CaP¹⁶⁵⁻¹⁶⁶.

11.2 Gen de fusión *TMPRSS2-ETS*

11.2.1 Mecanismos moleculares del cáncer

En los últimos años se ha producido un gran incremento de los conocimientos relacionados con las bases moleculares de las neoplasias humanas, a lo que ha contribuido fundamentalmente el desarrollo de la biología celular y molecular. Con el descubrimiento del cromosoma Filadelfia (Ph), en la década de los 60 llevado a cabo por Nowell y Hungerford en la leucemia mieloide crónica, se demostró por primera vez la existencia de una alteración cromosómica específica en un proceso maligno humano¹⁶⁷. Posteriormente, el desarrollo de

las técnicas citogenéticas facilitó la ampliación de las investigaciones en las neoplasias malignas y permitió la identificación de otras alteraciones cromosómicas vinculadas a determinados tumores¹⁶⁸.

En un principio se pensaba que estas alteraciones cromosómicas eran más bien consecuencia del proceso oncogénico y no la causa. Sin embargo, este criterio cambió completamente, cuando mediante las técnicas de biología molecular se puso en evidencia la existencia de genes específicos implicados en las alteraciones cromosómicas presentes en gran cantidad de tumores. Así, hoy en día sabemos que la transformación neoplásica de una célula constituye un proceso complejo en el que diferentes alteraciones genéticas hacen que dicha célula escape al control fisiológico de regeneración celular. Esta transformación obedece fundamentalmente a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores tumorales.

11.2.2 Estructura del gen

Un gen es una secuencia lineal de nucleótidos de ADN o ARN esencial para una función específica en el desarrollo o en el mantenimiento de una función fisiológica normal. Esta constituido por diferentes elementos¹⁶⁹⁻¹⁷⁰:

- Gen estructural: formado por secuencias que se expresan y se llaman exones y otras intercaladas entre ellas que son los intrones. La secuencia de base de los exones determina la secuencia de los aminoácidos de la cadena peptídica codificada por el gen. Los intrones no participan en la composición del producto proteico, ya que se eliminan durante el proceso de empalme que se efectúa para la estructuración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm).
- Región promotora: Se sitúa inmediatamente por delante del gen estructural y está constituida por secuencias esenciales para la iniciación precisa y eficiente de la transcripción, mecanismo que puede ser regulado por factores de transcripción.
- Secuencias intensificadoras: se pueden localizar en ambos lados del gen, a distancias variables, aunque generalmente alejadas. También se pueden ubicar en los intrones dentro del gen. Estas secuencias pueden estimular la expresión del gen después de su unión con factores de transcripción.
- Secuencias silenciadoras o represoras: tienen una función opuesta a la intensificadora. Cuando a ella se une el factor de transcripción apropiado, se inhibe la expresión del gen

bajo su control.

11.2.3 Concepto de proto-oncogén y oncogén

Los proto-oncogenes son genes que regulan el crecimiento y diferenciación celular. Sus proteínas se expresan en diferentes momentos del ciclo y son imprescindibles para su regulación. Determinados cambios estructurales y/o funcionales en los proto-oncogenes contribuyen a la malignización de la estirpe celular, convirtiéndolos en oncogenes. Estos oncogenes originarán proteínas con expresión/función alterada que favorecerán el crecimiento y/o la invasividad tumoral.

La activación de proto-oncogén a oncogén puede producirse por diferentes mecanismos:

- Translocación: cuando una parte de un cromosoma se liga a otro. Esto da lugar a una alteración en la transcripción del ADN.
- Mutaciones puntuales: sustitución de un par de bases (bp) por otro par en una secuencia de ADN, por ejemplo G:C por A:T.
- Amplificación: las células eucariotas están formadas por un genoma diploide, es decir, tienen dos copias de cada gen. En determinadas circunstancias una de las copias puede multiplicarse miles de veces, aumentando su tasa de expresión, dando lugar a la amplificación del gen. Es uno de los mecanismos más frecuentemente implicados en la carcinogénesis.
- Mutagénesis por inserción: producida por la inserción del ADN de un virus en el genoma del huésped.

11.2.4 Genes supresores tumorales

Los genes supresores tumorales, en condiciones normales, controlan el ciclo celular evitando el crecimiento excesivo y con ello inhibiendo el crecimiento celular. Cuando se produce una mutación en estos genes, sus proteínas no se expresan o dan lugar a proteínas no funcionales, favoreciendo la aparición del proceso de carcinogénesis, ya que no existe un control de la proliferación celular. Éste es un mecanismo recesivo, es decir, que para que estos genes supresores adquieran su capacidad oncogénica, necesitan sufrir mutaciones independientes en ambos alelos. Los mecanismos por los cuales se puede alterar la expresión de los genes supresores son similares a los descritos para los proto-oncogenes. Son

numerosos los genes supresores estudiados, entre los más conocidos tenemos p53, retinoblastoma (RB), DCC, MCC, APC, NF1, NF2 y WT-1.

11.2.5 Transmisión de la información génica

Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. Para que se lleve a cabo la transcripción génica de forma correcta es fundamental que estos factores actúen de forma bien estructurada y coordinada. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Los factores de transcripción tienen diferentes funciones:

- Interaccionan con regiones específicas del ADN
- Con elementos de la transcripción (como la ARN polimerasa)
- Con otros factores de transcripción
- Con moléculas que activan o inhiben su actividad
- Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales.

El conjunto de los factores de transcripción de una célula dibuja una red transcripcional cuyas conexiones determinan el conjunto de genes que se expresan en un determinado momento (transcriptoma). Una alteración en cualquiera de los genes implicados en esta red de señales puede contribuir a la transformación neoplásica¹⁷¹. De hecho, es en estas categorías de genes donde englobamos a los oncogenes (Tabla 6).

Tabla 6: Clasificación oncogenes según su participación en el sistema de información celular.

Factores de crecimiento
SIS, HST, INT-1, INT-2, FGF-5
Tirosinquinazas
<i>Receptores de la membrana celular:</i> ERB B ₁ , ERB B ₂ (NEU), FMS, KIT (<i>locus W</i>), RET, MET, TRK, ROS, SEA
<i>Proteínas celulares asociadas a la membrana:</i> ICK, SRC, FGR, YES, ABL, FES
Proteínas G
H-RAS, K-RAS, N-RAS, GSP, GIP
Serin/treoninquinazas citoplasmáticas
MOS, RAF/MIL, PIM ₁ , COT
Proteínas nucleares (factores de transcripción)
ERB-A, JUN, FOS, MYB, MYC, RARA, TAL-1, E2A, LYL-1, PBX, HOX ₁₁ , RBTN ₁ , RBTN ₂ , EVI-1, REL, VAV, ETS, SKI

11.2.6 Genes de fusión

Los genes de fusión son un tipo de oncogenes que han cobrado relevancia en las últimas décadas. Originalmente se asociaron con cánceres hematológicos como la leucemia y linfomas, aunque recientemente, con los avances en bioinformática, se ha encontrado también su amplia asociación con tumores sólidos como los sarcomas, carcinomas y tumores del sistema nervioso central. Los genes de fusión tienen un papel prometedor pues por su expresión específica pueden ser dianas terapéuticas. Por lo tanto, el descubrimiento y elucidación de estos genes puede proporcionar avances no solo en el diagnóstico sino también en el tratamiento.

El desarrollo de los genes de fusión viene dado por un reordenamiento cromosómico, el cual se puede llevar a cabo por dos mecanismos¹⁷²⁻¹⁷³:

- Un primer mecanismo consiste en una translocación recíproca, en la cual existen dos puntos de ruptura muy precisos. Uno de estos puntos de ruptura se sitúa en el lugar

de un proto-oncogén que se desregula y hace que se transforme en oncogén. El nuevo segmento creado es un gen de fusión que produce una proteína de fusión (por ejemplo la fusión de los genes BCR-ABL en la t(9;22) de la leucemia mieloide crónica).

- Un segundo mecanismo se explica porque tras el reordenamiento cromosómico el proto-oncogén de un cromosoma se desregula por su proximidad a una secuencia reguladora de otro gen en el segundo cromosoma. En este caso el proto-oncogén convertido en oncogén mantiene la estructura proteica normal pero se produce anormalmente (por ejemplo MYC en la t(8;14) en el linfoma de Burkitt).

Se ha demostrado que en pacientes con enfermedades neoplásicas existen frecuentemente reordenamientos cromosómicos específicos. En el caso de los tumores de estirpe epitelial (los carcinomas) no empezaron a estudiarse hasta que Tomlins SA¹⁷⁴ en 2005 identificara la fusión entre el gen de la serín proteasa transmembrana dos (TMPRSS-2) y genes de la familia de factores de transcripción ETS como fenómeno recurrente en el CaP. A diferencia de las neoplasias hematológicas, los carcinomas no presentan estos reordenamientos de forma tan constante y específica, sino que presentan perfiles cariotípicos más caóticos, lo que dificulta su estudio y estandarización. Es por esta dificultad en su estudio por lo que ha sido necesario el desarrollo tecnológico, el cual se ha dado por medio de la aparición de sistemas de estudio masivo en el que se pueden incluir muestras mayores y la capacidad de realizar análisis simultáneo de un subconjunto de genes (y así identificar patrones de comportamiento genómicos).

Una de las tecnologías de generación masiva de datos de expresión más utilizadas hoy en día es la creación de matrices tisulares (*microarrays*). Éstos ofrecen la posibilidad de estudiar a la vez, el comportamiento de una gran cantidad de genes bajo una serie de condiciones experimentales¹⁷⁶, así como genomas enteros que pueden almacenarse en un mismo biochip. Esta enorme base de datos de expresión puede aportar información útil, como saber qué genes se sobreexpresan, o qué patrones de comportamiento común existen entre las distintas agrupaciones de genes en la matriz. Para llegar a responder a estas preguntas, se requieren técnicas de estadística descriptiva y técnicas de minería de datos (técnica informática). Gracias a estos avances, se ha conseguido indentificar genes de fusión en subconjuntos de casos que ha facilitado la comprensión de los transcriptomas celulares, lo que ha supuesto un gran

avance en este campo¹⁷⁷⁻¹⁷⁸.

11.2.7 Gen de fusión TMPRSS2-ETS

11.2.7.1 TMPRSS2

El gen TMPRSS2 tiene una longitud de unas 43.59 kb y se localiza en el cromosoma 21, en la región q22.3, conteniendo 14 exones (Figura 4).

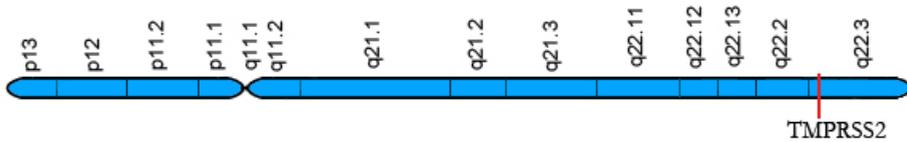


Figura 4: Localización del gen TMPRSS2 en el cromosoma 21.

Codifica la proteína TMPRSS2 de 70 KDa y 492 aminoácidos, que pertenece a la familia de las serín proteasas, las cuales se expresan en la superficie celular¹⁷⁸⁻¹⁷⁹. Esta proteína tiene actividad como receptor y consta de cuatro dominios (Figura 5): un dominio transmembrana tipo II, un dominio de clase A del receptor LDL (LDLRA), un dominio receptor-*scavenger* rico en cisteína (SRCR) y un dominio serín-proteasa. Al tener dominios intra y extracelulares, la TMPRSS2 puede trabajar como receptor para ligandos específicos mediando señales entre el ambiente y la células (están situadas de manera que pueden mediar la regulación entre diferentes células así como las interacciones entre la célula y la matriz celular)¹⁸⁰.

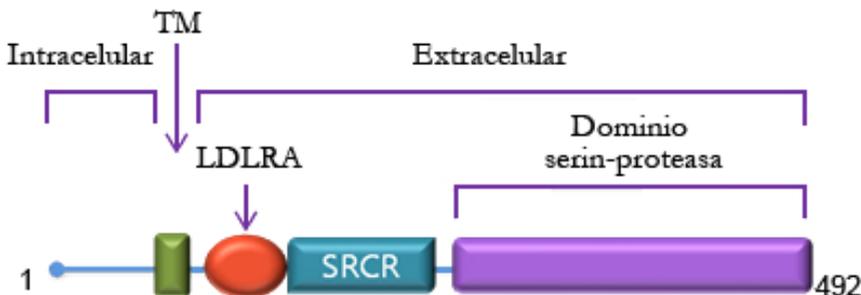


Figura 5: Dominios de la proteína TMPRSS2 (TM: Transmembrana, LDLRA: dominio de clase A del receptor LDL, SRCR: dominio receptor-*scavenger* rico en cisteína).

Se sabe que las serín proteasas están involucradas en muchos procesos fisiológicos y patológicos del ser humano. La proteína TMPRSS2 se expresa en condiciones normales, con una expresión elevada en las células de intestino delgado y en menor proporción en otros tejidos, como la próstata, colon, estómago y glándulas salivares. La función concreta normal de esta proteína no se conoce pero se asocia con procesos como la digestión, remodelamiento tisular, coagulación, fertilidad, respuesta inflamatoria, invasión celular tumoral y apoptosis.

En el caso de la próstata se sobreexpresa en el tejido prostático neoplásico comparado con la hiperplasia benigna de próstata, encontrándose sobreexpresada en pacientes con CaP. Sin embargo, en aquellos casos de tumores hormono-resistentes su expresión está disminuída¹⁸¹⁻¹⁸³.

La expresión del TMPRSS2 es regulada por elementos respondedores a andrógenos (ERA) localizados en la zona del promotor. Los andrógenos y el RA son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de la glándula prostática normal, pero también juegan un papel importante en la iniciación y progresión del CaP¹⁸⁴. En estadios de hormono-resistencia, el RA mantiene su funcionalidad, mediando en el proceso de CaP por medio de múltiples mecanismos: hipersensibilidad a bajos niveles de andrógenos, por amplificación del locus del RA y por activación en ausencia de andrógenos o por medio de otros ligandos. Todos estos mecanismos permiten al RA actuar en presencia de bajos niveles de andrógenos. Consecuentemente, TMPRSS2 juega un papel importante en la progresión del CaP a pesar de tratamientos supresores hormonales, ya que su promotor lleva a la expresión del gen de fusión.

11.2.7.2 ETS

La familia de los factores de transcripción ETS en los mamíferos consta de aproximadamente 30 genes homólogos al gen *Ets-1* (el oncogén E26 v-ets o virus de la eritroblastosis) el cual se localiza en el cromosoma 11 (11q24.3) y tiene una longitud de 63 kb con 8 exones. Los productos de esta familia de genes son factores que controlan varias funciones celulares, en conjunción con otras familias de factores de transcripción y cofactores. Todos los miembros de la familia ETS se caracterizan por conservar un dominio *Ets* para la unión al ADN responsable del reconocimiento específico de la secuencia motif 5'-GGA(A/T)-3' de activación o de supresión de la transcripción.

Esta familia de factores de transcripción juega un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación, proliferación celular, apoptosis y remodelación tisular. Es por ello que la

disregulación de estos genes puede llevar a la transformación tumoral en las células.

El ERG forma parte de la familia de los ETS, localizado en el cromosoma 21 (21q22.2) y contiene 11 exones y aproximadamente 300 kb de longitud (Figura 6).

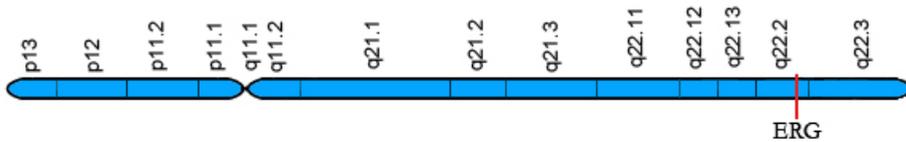


Figura 6: Localización del gen ERG en el cromosoma 21.

La proteína ERG puede interactuar con otros miembros de la familia ETS así como con otros factores de transcripción, como Jun y Fos (gracias a su dominio proteína-proteína)¹⁸⁵. La presencia de su dominio ETS le permite unirse a las secuencias ricas en purina y de esta manera interferir en numerosos procesos celulares, incluyendo remodelación de membrana, angiogénesis, diferenciación, proliferación y carcinogénesis¹⁸⁶⁻¹⁸⁷.

Además, se sabe que las isoformas del ERG regulan la metilación a nivel del ADN¹⁸⁸.

La sobreexpresión de ERG lleva consigo la formación de tumores sólidos, sin embargo todavía se desconocen los mecanismos moleculares concretos del ERG como factor de transcripción.

11.2.7.3 Tmprss2-ETS

Tomlins et al. publican en 2005 la relación entre CaP y el gen de fusión Tmprss2-ETS. El método bioinformático mediante el cual consiguieron identificarlo, denominado con el acrónimo COPA (*Cancer outlier profile analysis*) se basa en la utilización de *microarrays* de expresión y una base de datos conocida como *Oncomine*¹⁸⁹. Mediante el sistema COPA se obtuvieron los perfiles *outliers* (aquellos marcadamente expresados en un subconjunto de casos) de diferentes tumores, entre ellos el cáncer de próstata. Encontraron que los genes ETV1 y ERG (ambos pertenecientes a la familia ETS) se sobreexpresaban de forma recurrente en las células prostáticas tumorales. Para conocer el mecanismo por el cual se obtenía sobreexpresión de ambos genes, realizaron posteriormente una PCR cuantitativa

(qPCR). Sin embargo, no encontraron amplificación de ERG ni ETV1 a pesar de realizarla con las muestras en las que había salido sobreexpresión en el transcrito, por lo que se consideró la posibilidad de que existiera un reordenamiento de ADN. Para corroborar esta hipótesis, debían primero saber cuál era el gen que se unía en 5' a ERG o ETV1. Para ello se utilizó la técnica de amplificación rápida de extremos de ADNc, encontrando al gen TMPRSS2 en posición 5' del gen de fusión descubierto. Objetivaron que los reordenamientos se producían en los exones 1 y 2 de TMPRSS2 con el exón 4 de ETV1, y del exón 1 del TMPRSS2 con el 4 del ERG. Estos genes de fusión aparecieron en el 57% de las muestras y dentro de éstas el reordenamiento más frecuente (72%) fue el acaecido entre el TMPRSS2 y ERG¹⁷⁴.

Fusiones alternativas TMPRSS2 y ETS

Tras el estudio de Tomlins se han caracterizado diferentes tipos de fusiones génicas además del ERG y el ETV1, como son otras variantes de los ETS (ETV4 y ETV5)¹⁹⁰⁻¹⁹³ (Figura 7).

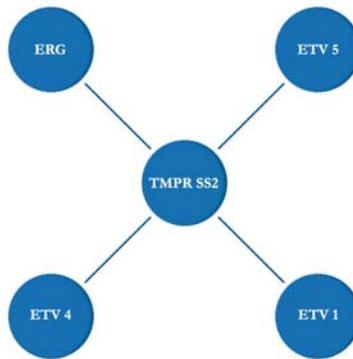


Figura 7 : Fusiones entre TMPRSS2 y miembros familia ETS

Además, otros trabajos han mostrado diferentes transcritos obtenidos tras la fusión de ERG, ETV1, ETV4 y ETV5 con otros genes, como es el caso del SLC45A3 (expresa una proteína canal que está en el cromosoma 1, HERV-K_22q11.23, C15orf21, CANT1 y KLK2, los cuales son específicos de la próstata¹⁹⁴).

Tanto el TMPRSS2, SLC45A3, HERV-K_22q11.23, CANT1 como KLK2 son secuencias reguladas por andrógenos, mientras que el C15orf21 no.

Prevalencia del gen de fusión TMPRSS2-ETS

La frecuencia de la fusión entre TMPRSS2 y ETS está en torno al 50%, como se ha visto en diferentes estudios, como el multicéntrico en el que participaron varios continentes y se incluyeron más de 1500 pacientes¹³⁴. Estos datos son compatibles con los mostrados por estudios posteriores con prevalencias de fusión positiva entre 44-46% en pacientes con diagnóstico de CaP¹⁹⁵.

De las posibles combinaciones, la fusión de TMPRSS2 con ETV1, ETV4 y ETV5 son relativamente raras (en torno a un 2-10% de los CaP)¹⁹⁶, siendo la fusión que se da entre TMPRSS2 y ERG la más frecuente, apareciendo en aproximadamente el 85% de los CaP con fusión positiva^{197,134}.

Mecanismos de reordenamiento y transcriptomas

Tanto el TMPRSS2 como el ERG se localizan en el cromosoma 21 y están separados por 2,8 mega-bases (Mb). Además, tienen la misma orientación transcripcional, por eso el reordenamiento puede ocurrir con cierta facilidad. Se puede llevar a cabo por dos mecanismos¹⁹⁸ (Figura 8):

- Por translocación: en este caso un gen se mueve a otra localización
- Por deleción intersticial: se pierde esta región intermedia de aproximadamente 3 Mb que los separa.

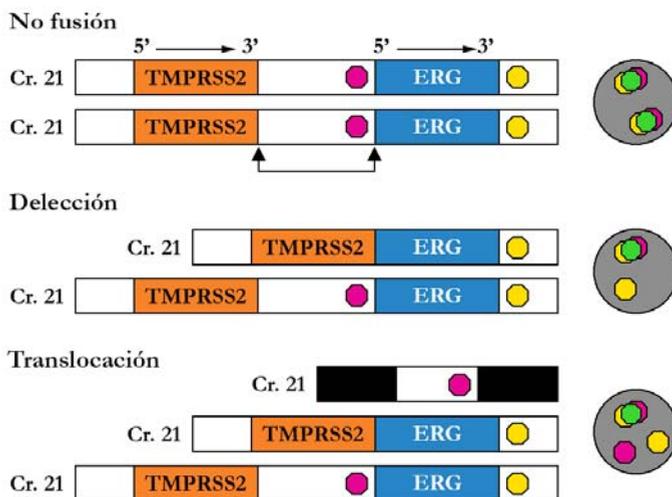


Figura 8: Mecanismos de formación de gen de fusión TMPRSS2-ERG

El mecanismo más estudiado para este gen de fusión es el de la delección, encontrando que los genes que existen en este segmento deleccionado son: ETS2, DSCR, BRWD1, HMGN1, C21orf13, SH3BGR, B3GALT5, PCP4, DSCAM, BACE2, FAM3, MX2 y MX1¹⁹⁹.

Dentro de la fusión de TMPRSS2 Y ERG, se ha observado que existe heterogeneidad en el sitio de ruptura pudiendo unirse los exones 1,2 y 3 del TMPRSS2 con los exones 2,3,4,5, ó 6 del ERG. Con cada una de estas combinaciones se puede obtener diferentes transcritos, de hecho se han llegado a caracterizar hasta 14, cada uno de ellos con secuencias diferentes que pueden suponer distintos patrones de agresividad²⁰⁰. La fusión que con más frecuencia se da y la más estudiada es la que ocurre entre el exón 1 del gen TMPRSS2 y el exón 4 del ERG²⁰¹.

El reordenamiento cromosómico finalmente implica la formación de una proteína con una nueva o alterada actividad. De los posibles 14 transcritos, 5 no son codificantes, 2 transcriben la proteína ERG normal, 6 codifican la proteína ERG truncada y uno codifica una nueva proteína de fusión TMPRSS2-ERG²⁰¹.

Asociación de TMPRSS2-ETS con características morfológicas

Se sabe que la fusión imprime unas características fenotípicas concretas en el CaP. Mosquera y cols. identificaron 5 patrones morfológicos relacionados con la presencia o ausencia de la fusión:

- Mucina con tinción azul
- Patrón de crecimiento cribiforme
- Macronucleolos
- Crecimiento tumoral intraductal
- Células en anillos de sello

Observaron que aquellas muestras que contenían tres o más de estas características casi siempre presentaban la fusión (93% de los casos), mientras que sólo un 24% tenía el reordenamiento cuando ninguna de estas características anatompatológicas estaba presente²⁰².

Otros estudios también han relacionado las alteraciones moleculares con las características anatompatológicas, encontrando una mayor frecuencia del gen de fusión ante la presencia de carcinomas mucina-positivos²⁰³. o asociación del gen con la IPN, mucina azul positiva y crecimiento intraductal²⁰⁴.

Sin embargo, todavía hacen falta más estudios que caractericen el fenotipo morfológico de los tumores con el reordenamiento genómico, así como de cada una de sus variantes.

Papel del gen de fusión TMPRSS2-ETS en el desarrollo del cáncer de próstata

El rol que desempeña el gen de fusión en el desarrollo del CaP, hoy en día no se conoce con exactitud. Inicialmente se identificó la fusión en el CaP localizado y en CPRC, pero diferentes estudios han mostrado que el TMPRSS2-ERG no solo está presente en próstatas tumorales, sino que también podemos encontrarla en la HBP, en el HGPIN²⁰⁵ y en ocasiones en tejido no tumoral adyacente al foco de CaP²⁰⁶⁻²⁰⁷.

Centrándonos en los casos de HGPIN, observamos que la frecuencia de fusión es menor que en el CaP, rondando el 20%, y se hipotetiza que en estos casos el PIN de alto grado derive en un CaP²⁰⁸. De hecho, en el estudio de Mosquera del 2008, se observa que aquellos casos de HGPIN en los que existe reordenamiento ERG siempre se asocia la

presencia de cáncer con fusión positiva²⁰⁹.

Esta observación nos sugiere que los reordenamientos cromosómicos de ETS puedan estar involucrados en el proceso de carcinogénesis del CaP. De hecho hay cierta evidencia en estudios *in vitro*, de que los genes de la familia ETS están involucrados en la transición de tejido normal a tejido tumoral así como con la diseminación a distancia. Por una parte por su papel en la invasividad y el desarrollo de metástasis por migración celular²¹⁰ y por otra, por su posible relación con la proliferación tumoral²¹¹.

En el caso de la sobreexpresión ERG además de estar relacionada con la invasividad y motilidad celular, se han encontrado otros mecanismos carcinógenos específicos²¹²⁻²¹³:

- Metilación de histonas: presentando niveles elevados de histona-deactilasa 1 (HDAC1) y con ello la subsiguiente infraexpresión de los genes diana de la HDAC1²¹⁴. Este mecanismo es frecuente en el CaP, pero más uniformemente encontrado en el caso de la fusión TMPRSS2-ERG²¹⁵.
- Sobrerregulación de la vía Wnt: conduce a la transcripción de numerosos genes implicados en la tumorigénesis, incluyendo al RA, MYC, JUN, cyclinD1, BMP4 y MMP7²¹⁶. La importancia de la vía Wnt y el gen de fusión en el CaP es el incremento resultante en la transcripción y expresión del RA. Consecuentemente, la transcripción del gen de fusión aumenta y se amplifica la expresión de ERG. Más todavía, la beta-catenina y el RA interactúan por medio de un estímulo androgénico regulando genes diana del RA, de manera que en aquellos tumores resistentes a hormonas, tanto los genes diana de uno como de otro, se expresan²¹⁷.
- Activación del oncogén C-MYC y como resultado la sobreexpresión del mismo. Los estudios al respecto muestran que ERG es capaz de activar a C-MYC de forma que la sobreexpresión de ambos resulta en la supresión de los genes encargados de la diferenciación celular a nivel del epitelio prostático. Esto se ha relacionado con una menor supervivencia libre de recaída²¹⁸.
- Inhibición de la apoptosis²¹⁹.
- Unión a BCRA-1, un coactivador del RA, y conjuntamente median la expresión de receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-IR)²²⁰.
- Unión a regiones promotoras de CXCR4 y ADAMTS1, dos genes involucrados en la motilidad e invasión celular²²¹.

En el caso de los genes ETV1 y ETV5, cuando están sobreexpresados, parece ser que inducen también a un programa de invasión celular²²².

Otra evidencia a favor del papel del gen de fusión en la transición a tumores invasivos es que la prevalencia del reordenamiento en las metástasis por cáncer de próstata es similar a la del CaP localizado (37%)²²³. Además, se ha encontrado una relación importante entre el foco de CaP y la metástasis. Cuando se analizan los distintos focos de metástasis por CaP se extraen dos conclusiones:

- Por una parte que todos los focos metastáticos presentan el mismo reordenamiento cromosómico que el foco prostático (Si un foco de CaP tiene fusión positiva, las lesiones a distancia tendrán el mismo clon celular, con la misma fusión. De la misma manera, aquellas metástasis con fusión negativa tampoco la tendrán en el foco prostático).
- Por otra parte, todos los focos metastáticos con TMPRSS2-ERG positiva presentan una delección intersticial (Edel)

Ello sugiere que las metástasis por CaP provienen de la evolución de un clon de células malignas de un único foco tumoral prostático que es el que lleva a la diseminación, y que es el mecanismo de delección el que conlleva a un pronóstico más desfavorable²²³. De ahí la importancia del conocimiento de los diferentes focos carcinógenos en la próstata, pues es importante a la hora de predecir el pronóstico clínico del paciente.

Sin embargo, el hecho de que haya tumores prostáticos con la fusión negativa, hace pensar que existen diferentes vías patogénicas que llevan a diferentes enfermedades prostáticas con o sin la participación de la vía ETS. Los tumores con fusión positiva o negativa tienen características morfológicas diferentes, con firmas de expresión únicas y diferentes resultados clínicos. De hecho hay numerosas evidencias que parecen apuntar al hecho de que los CaP con el gen TMPRSS2-ETS, y los que no lo contienen, constituyen dos grupos diferenciados dentro de la enfermedad tumoral prostática. Así, podemos considerar que existen dos perfiles de tumores prostáticos: los que tienen la fusión ETS y los que no la tienen^{224,206}. Los tumores con fusión TMPRSS2-ETS negativa pueden tener otro tipo de fusiones, desarrollarse por otros mecanismos moleculares u ocurrir en diferentes estadios de la diferenciación celular. Hasta la fecha se han identificado nuevos marcadores para aquellos casos en los que no aparece el gen de fusión, encontrando en ellos con mayor frecuencia sobreexpresado el

SPINK1. La expresión de este gen se ha relacionado con una recidiva bioquímica más temprana²²⁵⁻²²⁶.

Multifocalidad del Cáncer de próstata y gen de fusión TMPRSS2-ERG

El concepto de multifocalidad del CaP implica que en una misma glándula prostática puedan existir diferentes focos tumorales. En las series actuales se describen hasta un 75% de multifocalidad en piezas de prostatectomía radical²²⁷. Cuando analizamos la aparición del gen de fusión o no en los diferentes focos de una pieza, vemos que también existe heterogenicidad. Se han encontrado en una misma próstata focos tumorales con distintas isoformas del gen de fusión o sin tenerlo, e incluso, dos isoformas en el mismo foco^{207,228}. Es más, pueden existir fusiones en diferentes focos desarrolladas por diferentes mecanismos (delección o translocación) (Figura 9), así como diferentes genes implicados, como ERG y ETV1 en una misma próstata²²⁴. Diferentes estudios reportan tasas de entre 41-67% de focos tumorales que difieren respecto a la presencia del gen de fusión o el mecanismo de fusión^{206,207,228}.

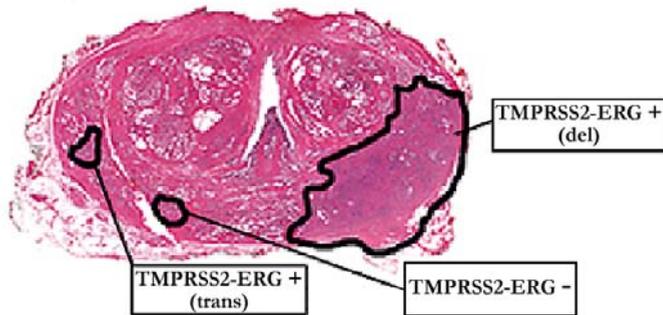


Figura 9: Heterogenicidad de focos de CaP con fusión TMPRSS2-ERG positiva/negativa (trans: translocación, del: delección)

Cuando en un mismo foco aparece la fusión, prácticamente todas las células la contienen sugiriendo de nuevo que múltiples clones tumorales se desarrollan en la próstata, de forma que cada paciente puede desarrollar múltiples cánceres en su próstata. De estos focos, algunos clones desarrollarán metástasis y otros no. De ahí el potencial papel diagnóstico y pronóstico del gen de fusión, pues hoy en día el diagnóstico se basa en el foco tumoral de

mayor tamaño o con mayor grado de Gleason, cuando nos puede aportar información más útil saber qué clon tumoral es el que va a llevar a la diseminación.

Relación gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y andrógenos

Como ya se ha comentado anteriormente, el gen *TMPRSS2* es estimulado por andrógenos a nivel de su promotor y está sobrerregulado en el CaP e infraregulado en los CPRC. Consecuentemente, la estimulación androgénica puede favorecer la expresión de *ERG* en el gen de fusión¹⁷⁴. De hecho la expresión del gen de fusión se pierde cuando hay un bloqueo de la señalización androgénica recuperándose en el estadio hormonorresistente del tumor.

Al fusionarse *TMPRSS2* y *ERG* se produce una activación hormonodependiente del factor de transcripción y la disregulación de los factores de transcripción de la familia ETS en los elementos regulados por andrógenos localizados en la región 5' del *TMPRSS2*, hecho que puede llevar al desarrollo del cáncer de próstata, afectando al proceso biológico por medio de la proliferación celular, diferenciación, desarrollo, transformación y apoptosis.

Determinación de la fusión *TMPRSS2-ERG*

Hoy en día la determinación de la fusión la podemos realizar por medio de diferentes técnicas:

- Técnicas de PCR (cuantitativa y cualitativa): estudia el transcrito
- Técnicas de hibridación por fluorescencia in situ (FISH): estudio a nivel cromosómico. Son técnicas más complejas, más caras y requieren experiencia para su correcta interpretación.
- Secuenciación del ADN: técnica compleja
- Sobreexpresión de *ERG* mediante inmunohistoquímica (IHQ). Fácil de realizar y no excesivamente cara¹³⁷.
- Genechip: test complejo que requiere tejido fresco²²⁹.

En relación a las muestras requeridas para su determinación, en los estudios iniciales la

presencia del gen de fusión se evaluaba en piezas quirúrgicas congeladas y en piezas fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE), sin embargo en los últimos estudios se ha confirmado su detección tanto en sangre como en orina lo que facilita su determinación^{230-231,202}.

La comodidad de la recogida de muestra en orina ha hecho que en los últimos estudios sea el método más utilizado, pues permite la determinación del gen de una forma muy poco invasiva. Para obtenerla es necesario realizar previamente un masaje prostático mediante TR. La muestra debe contener al menos 30 mL de orina y introducida en tubos de recogida de AND/ARN con hielo, y transportada en contenedores específicos con hielo. Posteriormente la muestra se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar el sedimento y sobrenadante. El sedimento celular será posteriormente almacenado a -80°C hasta que sea procesado²³¹.

11.2.8 Implicaciones clínicas del gen de fusión TMPRSS2-ERG

Desde el estudio de Tomlins SA, ha proliferado la literatura en relación con el gen de fusión, con aportaciones importantes en la identificación de las diferentes fusiones, en el conocimiento de la prevalencia de las mismas y en el rol que desempeñan en la carcinogénesis. El reto en estos momentos es conseguir trasladar todos estos resultados y conocimientos sobre este biomarcador a la práctica clínica.

En este sentido, el gen de fusión en el cáncer de próstata se ha considerado como una herramienta prometedora por su potencial en cuanto a biomarcador diagnóstico y pronóstico, como diana terapéutica y por su contribución a la elucidación del desarrollo del CPRC²³². No obstante, hay disparidad de opiniones en cuanto a su utilidad. A pesar de ello siguen apareciendo numerosas publicaciones al respecto, con el objetivo de encontrar la aplicación clínica del gen de fusión.

Utilidad diagnóstica

La falta de especificidad del PSA para el diagnóstico de CaP y la invasividad de la biopsia prostática han hecho necesario la búsqueda de otros marcadores capaces de distinguir el cáncer indolente del clínicamente significativo y reducir el número de biopsias. En este sentido, la especificidad del gen de fusión y la posibilidad de detección en orina, hacen que

haya un interés creciente en el uso de este biomarcador como herramienta diagnóstica.

El gen de fusión aparece en aproximadamente el 50% de los casos de CaP, tal y como confirma un estudio multicéntrico en el que se incluyen 1500 pacientes¹³⁴. La sensibilidad de este marcador para la detección de CaP está en torno al del 50%, sin embargo, tiene una especificidad global aproximada del 90% y un valor predictivo positivo del 94%²³³. Cuando la determinación del gen de fusión la realizamos en orina se alcanza una especificidad del 93% y un valor predictivo positivo del 94%²³⁴. De forma que estamos ante un marcador con una especificidad elevada (superior a la del PSA) y que podemos determinar fácilmente en orina. Estos resultados sugieren que la comercialización de un test para la detección del gen *TMPRSS2-ERG* en orina sería técnicamente factible, sin embargo, uno de los problemas de los marcadores que se han estudiado hasta ahora (tanto el *PCA3* y el gen de fusión), es que solo identifican determinados subgrupos de casos de CaP. En este contexto, un abordaje para optimizar los resultados de estos marcadores para predecir el CaP sería desarrollar modelos que combinen diferentes biomarcadores, de forma que se cree un algoritmo útil en el que se identifiquen aquellos pacientes candidatos a una biopsia prostática.

En un estudio reciente se compara la rentabilidad de la calculadora de riesgo del estudio europeo randomizado de CaP (ERSPC) y del gen de fusión. La calculadora de riesgo ERSPC es utilizada por los urólogos para predecir el riesgo de CaP y determinar la agresividad por medio de las variables PSA, volumen prostático, biopsias previas, etc²³⁵. Se observa que el gen de fusión ofrece un valor predictivo positivo adicional a la calculadora de riesgo ERSPC. Cuando además del *TMPRSS2-ERG* añadimos el *PCA3*, aún mejora más el rendimiento diagnóstico (de 0,79 a 0,84)²³⁶. Diferentes estudios han ido en esta línea, y los resultados obtenidos corroboran la hipótesis del aumento de la rentabilidad diagnóstica mediante el uso de un panel de marcadores. Este es el caso del estudio de Salami del 2013, en el que se evalúa el rendimiento diagnóstico del PSA, *PCA3* y *TMPRSS2* solos y de forma combinada, obteniendo que la capacidad de discriminar un CaP es mejor cuando juntamos los tres marcadores que cada uno por sí solo²³⁷. En otro trabajo en el que se incluyen diferentes marcadores prostáticos detectados en orina (*TMPRSS2-ERG*, *GOLPH2*, *SPINK1* y *PCA3*) se llega a la conclusión de que la combinación de todos ellos aporta una mayor sensibilidad en la detección de CaP²³⁸.

Por lo tanto, la utilidad diagnóstica del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* no está completamente definida. Actualmente no se considera una herramienta diagnóstica de primera

línea, por una parte por el elevado coste que supone y por otra porque por la heterogenicidad del CaP. Sin embargo, sí parece que su utilidad diagnóstica llegará en un futuro mediante la creación de paneles que combinen diferentes marcadores.

Utilidad pronóstica

Inicialmente el gen de fusión se asoció con un CaP desfavorable, sin embargo hoy en día está en debate su utilidad como marcador pronóstico. Múltiples estudios han comparado parámetros clínico-patológicos y la significación pronóstica de este gen de fusión, con resultados controvertidos.

Algunos estudios han encontrado una asociación entre la presencia del gen de fusión y un mayor grado tumoral^{135,239}. Sin embargo otros como el de Lapointe del 2007 no ha visto relación entre la presencia del gen de fusión y un Gleason desfavorable^{240,203}.

Otros trabajos solo encuentran asociación del gen de fusión con el estadio tumoral²⁰⁰. En el caso del estudio de Fitzgerald del 2008, muestra con detalle cómo varían sustancialmente las prevalencias del gen de fusión según el estadio, descendiendo a un 15% en el T1²⁴¹.

En cuanto a significación pronóstica, evaluada en la mayor parte de los casos como la tasa de recurrencia bioquímica, también encontramos resultados dispares en la literatura, mostrando algunos autores una mayor tasa de recurrencia cuando existe la fusión génica²⁴², e incluso una mayor probabilidad de progresión y mayor MCE^{241,243}. De la misma manera, la ausencia del gen se ha relacionado con una mayor supervivencia libre de progresión²⁴⁴⁻²⁴⁵. En otros trabajos no obstante, no encontraron asociación de la presencia del gen de fusión con el pronóstico²⁴⁶⁻²⁴⁸, es más, encuentran que aquellos pacientes con la presencia del gen de fusión tienen un pronóstico más favorable, sin encontrar asociación con factores relacionados con el pronóstico como el Gleason, el estadio tumoral o el PSA preoperatorio²⁴⁴ o una supervivencia libre de recurrencia mayor en los casos de fusión positiva^{135,245}.

Estas diferencias tan llamativas y dispares cohortes de pacientes utilizadas: algunos de ellos seleccionan pacientes con CaP localizado, otros incluyen pacientes con CPRC, unos realizan test diagnóstico mediante PCR (qPCR o RTPCR) y otros mediante FISH, unas muestras se obtienen de tejido fresco, otras de parafina y unas de pieza de PR, otras de biopsia y otras de orina tras masaje prostático. Además, gran cantidad de trabajos con conclusiones relativas al pronóstico se han realizado con muestras pequeñas^{200,242}.

Por otra parte, no sólo la presencia o ausencia del gen se ha relacionado con factores pronósticos, sino que también características propias del mecanismo de fusión pueden influir en la agresividad del tumor. Es el caso de aquellas fusiones que ocurren como consecuencia de deleciones. Se ha observado que este mecanismo de fusión génica se asocia con mayor frecuencia con factores de riesgo desfavorables²⁴⁹ y con una peor supervivencia cáncer específica que aquellas fusiones que se dan por translocación²⁴¹. Se hipotetiza que la pérdida de los genes ETS2 y HMGN1 del segmento delecionado puede jugar un papel importante en la progresión tumoral, independientemente del componente oncogénico que ya supone el producto de la fusión TMPRSS2-ERG. De hecho, se ha observado que en aquellos casos en los que existe sobreexpresión de ERG el gen HMGN1 se expresa en menor cantidad²⁴⁹. También en relación al mecanismo causante de la fusión, se ha descrito la categoría “2+Edel” la cual hace referencia a la aparición de duplicación en combinación con deleción de 5'-ERG, asociado a peor pronóstico (25% de supervivencia a los 5 años)²⁴¹. Se ha observado que esta nueva categoría “2+Edel” es un factor pronóstico independiente además del Gleason y PSA preoperatorio.

También el transcrito resultante de la fusión puede implicar un peor pronóstico, de manera que la fusión entre el exón 2 de TMPRSS2 y el exón 4 del ERG implica una enfermedad más agresiva, y si es con el primer codón ATG del exón 3 del ERG se ha relacionado con invasión de vesículas seminales. Otras isoformas se han asociado a una recurrencia temprana²⁰⁰.

De esta manera, parece ser que la detección del gen de fusión puede jugar un papel importante a la hora de predecir la agresividad tumoral, detectando focos tumorales que según la presencia o ausencia del gen, así como el mecanismo de la fusión, puedan tener diferente implicación pronóstica. Sin embargo, para poder aplicarlo en la práctica clínica queda por establecer una correlación entre el test del gen de fusión, la biopsia prostática, la historia natural del tumor y los resultados tras el tratamiento, para lo que son todavía necesarios más estudios.

Diana terapéutica

La señal androgénica es fundamental para el desarrollo del CaP. Los tratamientos de deprivación androgénica siguen siendo la modalidad más utilizada en aquellos casos de CaP no

localizado.

Desafortunadamente, a pesar de que en muchos pacientes ha supuesto una mejora importante, es un tratamiento paliativo y no curativo, y además, muchos de estos tumores progresan a CPRC, con lo que este tratamiento deja de ser efectivo. Desde el 2010 empiezan a salir tratamientos relativamente eficaces para el CPRC, sin embargo no exentos de efectos secundarios y mejorías discretas en cuanto a la supervivencia. Como consecuencia, se hace indispensable el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas basadas en los conocimientos actuales de la biología molecular del CaP. Considerando que los factores de transcripción ETS están involucrados en la transformación maligna y la progresión tumoral, incluida la invasión, metástasis y neoangiogénesis, actuando a este nivel molecular podríamos obtener un tratamiento tumoral específico²⁵⁰.

Sabemos que en un 50% de CaP aparece la fusión TMPRSS2-ERG, la cual está mediada por andrógenos. La fusión lleva a la sobreexpresión de una proteína ERG truncada que es en la mayoría de los casos una proteína funcional a nivel de la próstata que promueve la transformación y progresión tumoral por diferentes vías. De esta manera, las estrategias de tratamiento deberían ir dirigidas a inhibir la fusión mediante el bloqueo de la señal androgénica o bien inhibiendo la actividad de la nueva proteína.

No se conoce hoy en día con exactitud el grado de implicación del gen de fusión en el desarrollo de la hormono-resistencia en el CaP, pero se ha observado que la abiraterona inhibe la síntesis de andrógenos y estrógenos que conducen a la fusión TMPRSS2-ERG, induciendo una regresión de la enfermedad en más del 50% de los pacientes con CPRC²⁵¹. De hecho, en un estudio fase II realizado por Attard y cols. se observó que el 80% de pacientes con el gen de fusión en CPRC (41% de fusión positiva) presentó un descenso de PSA de más del 90%, mientras que en aquellos casos de no descender significativamente, solo aparecía la fusión el 32% de los casos²⁵². Esto puede indicar que aquellos CaP con el reordenamiento genético pueden representar un subgrupo de tumores especialmente sensibles al bloqueo del CYP17.

Se ha observado que así como existe una homogeneidad en la fusión en las metástasis respecto al foco original prostático, no ocurre lo mismo con el aumento de copias del RA o la reducción de PTEN, los cuales presentan más heterogeneidad. Además, no hay cambios en el status de ERG una vez se llega a la hormono-resistencia. Ello sugiere que el reordenamiento de ERG puede ser un evento más temprano en el proceso de la carcinogénesis prostática, la cual puede ir seguida de un aumento del RA en algunos casos o de una pérdida de PTEN en otros. Hay estudios en marcha que buscan antiandrógenos destinados a actuar a nivel del RA y pequeñas moléculas que inhiban el PTEN para conseguir otra vía de reversión de la

resistencia androgénica, sin embargo todavía no hay resultados concluyentes²⁵³.

En otro estudio llevado a cabo por Hermans y cols. se muestra que la fusión tiene un papel importante en el caso del CaP localizado, pero que esta vía es bypasada en el caso del CPRC²⁵⁴. Otros trabajos sin embargo, concluyen que muchos CPRC, incluyendo aquellos con fusión positiva, mantienen su dependencia androgénica^{251,255}, lo que lleva a pensar que aquellos pacientes con la fusión, pueden ser mejor respondedores al tratamiento hormonal.

En otro estudio publicado recientemente, utilizan lo que denominan siARN. Se trata de pequeños fragmentos de ARN que interfieren en la transcripción del mismo, siendo altamente específicos y eficientes a bajas concentraciones. El problema es que son muy hidrófilos e inestables en líquidos biológicos. Para mejorar su estabilidad, se utiliza tecnología de nanopartículas, de manera que se consigue aumentar su estabilidad (protegiéndola de la degradación de nucleasas y aportando un carácter hidrofílico) y mejorar su liberación. Los resultados in vitro e in vivo (en ratones) muestran una dismunición del crecimiento tumoral y migración celular por medio de inhibición de la oncoproteína ERG truncada²⁵⁶.

Además, la inmunoterapia hoy en día va ganando terreno, aportando nuevas modalidades terapéuticas. Los más estudiados hasta la fecha son los anticuerpos monoclonales que actúan como inhibidores (ej: ipilimumab y nivolumab), terapia de células adoptivas (ej: Células T que expresan receptores antigénicos quiméricos) y vacunas (ej: Sipuleucel-T). Están pendientes de aprobar vacunas contra antígenos tumorales para el cáncer de próstata, (estudio fase III Provenge o el Prostvas en fase II)²⁵⁷. En la actualidad se espera la llegada de nuevas terapias diana que consigan la inhibición de la fusión génica o del producto de la fusión, pues implicaría un gran avance en el manejo del CaP que está por llegar en un futuro próximo. Sin embargo, se necesitan todavía más estudios para tener un mayor conocimiento sobre la respuesta de estos tratamientos.

11.3 Estudio epigenético en el cáncer de próstata

11.3.1 Concepto de epigenética

La epigenética se define como el conjunto de cambios heredables en la expresión génica que no van acompañados de cambios en la secuencia de ADN. Los reguladores epigenéticos más importantes son la metilación del ADN, las modificaciones a nivel de histonas (metilación o acetilación) y los microARNs de expresión. Las modificaciones epigenéticas más estudiadas

son aquellas relacionadas con la metilación del ADN, la cual se da en el desarrollo normal de los mamíferos²⁵⁸. La metilación se produce exclusivamente en los nucleótidos de citosina que van seguidos de guanina (CpG) y se produce en el carbono 5' de la citosina²⁵⁹. Mientras que los dinucleótidos CpG están infrarepresentados en la escala genómica, hay agrupaciones de CpGs de unas 200 bp a varias kilobases de longitud (denominadas islas o islotes CpG) que se encuentran en las regiones promotoras de aproximadamente la mitad de los genes del genoma humano²⁶⁰.

Gracias a la metilación del los dinucleótidos CpG, se han podido desarrollar técnicas que permiten detectar cuantitativa o cualitativamente el estado de metilación. Por ejemplo mediante el uso de enzimas de restricción, PCR específica de metilación (MSP) que puede ser mediante PCR cuantitativa (qMSP) o técnicas basadas en curvas Melting entre otras.

La mayor parte de estas técnicas se basan en una transformación de la muestra con bisulfito, de tal manera que las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las metiladas mantienen la secuencia original y se quedan como citosinas. Este cambio es el que permite la posterior identificación a través del uso, por ejemplo, de cebadores específicos para muestras metiladas o no metiladas.

Los islotes CpG son los que suelen aparecer metilados comunmente, impidiendo la expresión de genes. De esta manera, la metilación del ADN se piensa que es un mecanismo fundamental de silenciamiento génica²⁶¹.

11.3.2 Epigenética y cáncer de próstata

El desarrollo y progresión tumoral son el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas. La metilación del ADN en las regiones promotoras de los genes supresores tumorales implica una silenciamiento de los mismos, de forma que juega un papel importante en la carcinogénesis.

Los biomarcadores epigenéticos se han convertido en un tema de interés en la oncología por su valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico²⁶²⁻²⁶³. Hay diferentes factores que hacen que el estudio de la metilación de ADN resulte atractivo para el diagnóstico molecular del cáncer.

- En primer lugar, el ADN es más estable que el ARN o las proteínas, tanto in vitro como in vivo.

- En segundo lugar, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones genéticas, la metilación del ADN ocurre en una región específica del promotor de un gen, lo que facilita el diseño del estudio.
- Además, dado que los diferentes tipos tumorales presentan diferencias en el patrón de metilación, se pueden desarrollar perfiles relativamente específicos para el diagnóstico.
- Existe la posibilidad de usar material obtenido mediante técnicas no invasivas o mínimamente invasivas. De hecho, el ADN se puede extraer de muestras parafinadas, lo que hace que no deban modificarse los métodos de conservación de muestras que se utilizan en la actualidad.
- La metilación de determinados genes es un episodio temprano en el desarrollo tumoral y, por tanto, puede servir como herramienta para la detección precoz.
- También se ha visto que puede aportar información relativa al pronóstico de la enfermedad, lo que hace que sean útiles a la hora de decidir el tratamiento adecuado.
- Y por último, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones genéticas, las epimutaciones son reversibles de diferentes formas (por ejemplo, farmacológicamente, mediante intervenciones metabólicas, etc.) lo que además supone una potencial opción terapéutica.

En el CaP se han observado patrones aberrantes de metilación de ADN y también en lesiones precursoras, sugiriendo que las alteraciones epigenéticas están involucradas en el proceso de transformación maligna²⁶⁴. Además, estas alteraciones epigenéticas permanecen constantes en la progresión de la enfermedad y en las lesiones metastásicas, indicando que también está relacionada con la expansión clonal²⁶⁵.

En los últimos años se han propuesto gran cantidad de genes como marcadores epigenéticos para el CaP: PITX2, C1orf114, GABRE-miR-452-miR-224, PTGS2, ABHD9, GSTP1, RASSF1, RARβ2, APC, HOXD3 ó Chr3-EST entre otros²⁶⁶.

Recientemente se han validado y se utilizan en la práctica clínica dos métodos diagnósticos epigenéticos que por medio de PCR determinan el estado de metilación de diferentes genes asociados al CaP. El primero es en ProCaM, utilizado con el fin de añadir valor predictivo a la biopsia prostática en varones con PSA entre 2 y 10 ng/mL. Incluye en estudio de los genes GSTP1, RARbeta2 y APC²⁶⁷. Por otra parte, el método ConfirmMDx

incluye los genes GSTP1, APC y RASSF1 y tiene como objetivo fundamental aumentar el valor predictivo negativo de las biopsias prostáticas, de forma que consigue reducir el número de rebiopsias²⁶⁸.

De hecho, no sólo es posible detectar la metilación en los cilindros de las biopsias, sino que se ha determinado también en muestras de sangre y orina, permitiendo la realización de tests diagnósticos menos invasivos²⁶⁹⁻²⁷⁰.

La investigación sobre el papel de la epigenética en el CaP nos puede ayudar a conocer mejor las vías moleculares implicadas en éste, identificar biomarcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Además de otros marcadores emergentes en el estudio del CaP como el PCA3, el gen de fusión, las 4K, etc., los marcadores de metilación de ADN también son potenciales candidatos a ser incluidos en nomogramas pronósticos, solos o en combinación con otro tipo de marcadores moleculares.

11.3.3 PITX2 y cáncer de próstata.

El PITX2 (Paired-like homeodomain transcription factor 2) es un gen inducido por la vía Wnt/betacatenina. Codifica una proteína que pertenece a la familia RIEG/PITX homeobox, la cual actúa como factor de transcripción y está involucrada en el desarrollo de diferentes órganos por medio de la regulación de la expresión del gen de la procolágeno lisina hidroxilasa. Juega un papel clave en la diferenciación de los fenotipos celulares (somatotrofo y lactotrofo) y está implicada en el desarrollo de los ojos, los dientes, los órganos abdominales, así como regulador transcripcional de genes implicados en la regulación hormonal de la prolactina. Mutaciones en este gen se han asociado al Síndrome de Axenfeld-Rieger, Síndrome de iridogoniodysgenesis, y a casos esporádicos de la enfermedad de Peters.

Además, la metilación de PITX2 se ha relacionado con patología tumoral como es el caso del la leucemia mieloide crónica²⁷¹, el cáncer de pulmón²⁷² y el cáncer de mama, donde se ha reportado como uno de los genes más útiles para predecir la recidiva a distancia²⁷³.

En el 2006 se establece la relación entre el CaP y el PITX2 pero no es hasta el 2009 cuando aparecen trabajos que muestran el PITX2 como un posible biomarcador pronóstico del CaP. El primer estudio al respecto fue el de Weiss y cols. el cual estableció que la hipermetilación de PITX2 estaba asociada a la Rbq temprana²⁷⁴. Vanaja confirmaba estos resultados, observando que el grupo de pacientes con CaP que presentaban hipermetilación a nivel de PITX2, tenían tres veces más probabilidades de Rbq que aquellos pacientes

hipometilados²⁷⁵. En este estudio evaluaron el perfil de metilación de ADN de seis genes: FLNC, EFS, ECRG4, RARB2, PITX2, GSTP1, PDLIM4 y KCNMA1. Los resultados revelaron que PITX2 se asociaba con la Rbq, la recaída local y sistémica.

En otro estudio reciente, Dietrich y cols. también concluyen que la hipermetilación de PITX2 es un buen predictor de recurrencia, añadiendo además información pronóstica a la puntuación de Gleason, PSA, y márgenes quirúrgicos²⁷⁶. Ven factible la utilidad del marcador para determinar de entrada aquellos tumores que van a precisar tratamiento adyuvante tras la prostatectomía radical.

En la misma línea, Vasiljevic y cols. observan que la metilación de PITX2 es un buen biomarcador de mal pronóstico en PCa. Además, estos autores sugieren que podría ser útil en pacientes con un Gleason bajo, pues en aquellos con un Gleason <7, la metilación de PITX2 fue significativamente mayor en pacientes que fallecieron por cáncer de próstata, comparados con aquellos que fallecieron por otras causas²⁷⁷.

No se conoce todo el mecanismo que implica al PITX2 en la carcinogénesis en el CaP, aunque en algunos trabajos han relacionado al gen PITX2 con la regulación de IGFR1 y el RA²⁷⁸.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El cáncer de próstata constituye un problema sanitario importante por su elevada incidencia. A pesar de que desde la aparición del PSA somos capaces de diagnosticarlo más precozmente, no se ha conseguido reducir la mortalidad de forma significativa. Además, las opciones diagnósticas de las que disponemos en la actualidad muestran deficiencias a la hora de clasificar al paciente según su riesgo real, de manera que muchos pacientes no se benefician del tratamiento, debiendo asumir iatrogenias innecesarias. Dado que hoy en día se busca la mejora de la calidad de vida del paciente, es importante poder diferenciar los tumores indolentes de los agresivos con el fin de evitar el sobretratamiento, el cual va en detrimento de la misma de una forma considerable. Son numerosos los estudios que han salido a la luz en los últimos años en busca de nuevos marcadores pronósticos a nivel molecular, sin embargo el CaP es una entidad muy heterogénea, de forma que ninguna hasta la fecha ha conseguido por sí sola aportar suficiente rendimiento. Algunos de estos marcadores ya se utilizan en la actualidad, pero todavía no están incluidos en las guías clínicas y es todavía necesario más tiempo para que estén al alcance la práctica clínica.

Nuestra hipótesis de trabajo es que ciertos marcadores inmunohistoquímicos, el gen de fusión TMPRSS2-ERG y el grado de metilación del gen PITX2 son factores pronósticos del cáncer de próstata tratado mediante prostatectomía radical.

OBJETIVOS

En relación a la hipótesis del presente estudio establecemos los siguientes objetivos:

Objetivos primarios:

- Determinar la relación de los parámetros clínico-patológicos de la serie de pacientes con diagnóstico de CaP con los diferentes marcadores inmunohistoquímicos evaluados, el gen de fusión y el grado de metilación del gen PITX2.
- Analizar la relación pronóstica en términos de recidiva bioquímica para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos, el gen de fusión y la metilación del gen PITX2.

Objetivos secundarios:

- Determinar la frecuencia de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos ERG, FAP, PSMA, PSA, RA, p53, P504S (racemasa), Topoisomerasa-IIa, E-cadherina, Beta-catenina en el CaP.
- Establecer la frecuencia de positividad del gen de fusión TMPRSS2-ERG determinado por PCRq en el CaP.
- Demostrar la correlación entre el gen de fusión por PCRq y la expresión proteica de ERG.
- Establecer el grado de metilación medio del gen PITX2 en una serie de pacientes con CaP.
- Analizar la correlación entre la positividad del gen de fusión TMPRSS2-ERG determinado por PCRq con la metilación del gen PITX2.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se selecciona una serie retrospectiva de pacientes con diagnóstico de CaP obtenido tras prostatectomía radical (PR) en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, entre Enero de 1999 y Diciembre 2005. Se decidió no ampliar la muestra a pacientes intervenidos en años posteriores para poder obtener un seguimiento a largo plazo.

Las muestras para el estudio se obtienen de los bloques correspondientes a las piezas de PR fijados con parafina, teniendo finalmente una muestra de 214 casos.

Como criterio de inclusión se consideraron los casos con confirmación anatomopatológica de CaP. Los criterios de exclusión fueron que en la pieza de prostatectomía radical no se hallara tumor o que hubieran llevado tratamiento previo con radioterapia u hormonoterapia.

De los casos seleccionados se obtuvieron los siguientes datos clínicos:

- Edad en el momento del diagnóstico: considerándolo en el momento en que se obtiene un resultado de neoplasia prostática en la biopsia
- PSA preoperatorio
- Estadío clínico (TNM clínico)
- Gleason de la biopsia prostática
- Grupo de riesgo según la clasificación D'Amico⁴²
- Estadiaje patológico (TNM patológico)
- Gleason de la pieza
- Existencia de invasión perineural
- Recaída bioquímica: Considerada como el incremento de PSA por encima de 0,2 ng/mL en dos medidas consecutivas separadas al menos por 3 meses⁷⁹. Consideramos pues la fecha de recaída bioquímica aquella en la que existe un primer PSA igual o mayor a 0,2 ng/mL.
- Recaída clínica: definida por la aparición de lesiones en técnicas de imagen
- Tiempo de seguimiento (en meses): Aquellos pacientes en los que se pierde el seguimiento tras la intervención no entran en el estudio

De todos los pacientes incluidos en el estudio se seleccionan por medio de la revisión de las láminas de hematoxilina-eosina de las piezas de PR por un uropatólogo experto aquellos bloques en los que existe una mayor carga tumoral. De estos bloques seleccionados se extraerá el material necesario para la realización de los diferentes estudios:

- Matrices de tejido (TMAs) para estudio de marcadores inmunohistoquímicos
- Evaluación de la existencia o no del gen de fusión TMPRSS2-ERG
- Estudio de la metilación del gen PITX2

2. MATRICES DE TEJIDO Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La técnica de matrices de tejido o “tissue microarrays” (TMA) hace posible agrupar gran cantidad de casos en una sola laminilla, que posteriormente puede ser utilizada para el análisis de numerosas proteínas diana, como en nuestro caso en el que la utilizaremos para la realización de técnicas inmunohistoquímicas.

Los marcadores inmunohistoquímicos que se han utilizado en el presente estudio se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Relación de marcadores inmunohistoquímicos.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Pretratamiento	Sistema de visualización
ERG	EP111	DAKO IR659	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	Linker Rabbit/EnVision FLEX
AMACR / P504S (RACEMASA)	13H4	DAKO IR060	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
PSMA	3E6	DAKO IR089	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
PSA	POLYCLONAL	DAKO IR514	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH bajo	EnVision FLEX
β -CATENINA	β -CATENINA-1	DAKO IR702	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
RECEPTOR ANDROGENICO	AR441	DAKO M3562	1/40	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
TOPOISOMERASA II α	3F6	NOVOCASTRA NCL-TOPO IIA	1/50	Autoclave 3' 1.5 atm. Tampón pH bajo	EnVision
E-CADHERINA	NCH-38	DAKO IR059	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
FOSFATASA ACIDA PROSTATICA	PASE/4LJ	DAKO M0792	1/400	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX
P53	DO-7	DAKO IR616	Prediluido (RTU)	PT Link Tampón pH alto	EnVision FLEX

2.1 Recogida de bloques y preparaciones histológicas: Selección de áreas

Para la construcción del TMA se obtuvo el material de los bloques de próstata en parafina que seleccionamos. De cada bloque se realiza un nuevo corte que es teñido con hematoxilina-eosina (H-E) como guía para seleccionar las regiones que deseamos muestrear.

De cada una de las laminillas de H-E y con la ayuda del microscopio óptico, el uropatólogo marca las áreas de interés para el estudio (dos por cada H-E), que son aquellas con mayor carga tumoral. Estas áreas marcadas se trasladan por comparación a los bloques, marcándose éstos con un rotulador indeleble al igual que lo estaban las laminillas.

2.2 Confección de planillas

Con ayuda del programa informático Word (versión 2010) se repartieron los 201 casos del estudio, (por mala calidad del corte histológico o por deficiente reacción de la tinción perdemos 13 pacientes para el estudio inmunohistoquímico) en 6 tablas (planillas de las matrices), conteniendo cada matriz o planilla entre 27 y 36 casos más 1 caso control. Las planillas se etiquetan para referenciarlas como TMA I 32, TMA II 36, TMA III 35, TMA IV 36, TMA V 35, TMA VI 27.

2.3 Preparación de las matrices

Se realizaron 6 bloques en blanco (sin agujeros ni burbujas) destinados a ser los receptores de los cilindros del estudio (cada cilindro corresponderá a una de las áreas seleccionadas). Estos bloques se debastaron con el microtomo para igualar su superficie, esto asegurará que los cilindros se corten todos al mismo tiempo.

Posteriormente con ayuda del *MTA1-manual Tissue Arrayer* (número de serie 2004615) de *Beecher Instruments Inc.* se construyeron las matrices tisulares siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Ajustar el bloque receptor en el portabloques, de modo que la superficie del bloque sea paralela a la placa base. Elegir el punto 0 de inicio de construcción de la matriz, el cual se sitúa en la esquina inferior izquierda, de tal manera que el resto de cilindros de la matriz quede centrado en el bloque receptor dejando suficiente parafina libre de cilindros rodeando toda la matriz (aproximadamente 2,5-3 mm). De esta forma evitamos problemas en el momento de cortar los bloques en el microtomo (como fragmentación de la parafina o pérdida de cilindros). Colocar a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros. A partir de este punto 0 nos desplazaremos por el eje X y el eje Y con ayuda de los mismos.
2. Elegir el juego de agujas apropiado. La aguja más gruesa de cada juego es la que hace el agujero en el bloque donante y saca el cilindro con tejido y la más pequeña hace el cilindro en el bloque receptor sacando solo parafina. En este caso utilizamos las agujas de 1 mm de diámetro.

3. No es necesario ajustar la profundidad de descenso de la aguja de menor diámetro porque está fija en nuestra matriz tisular mediante un tope.
4. Efectuar primero el agujero correspondiente al bloque de parafina receptor. Para ello se introduce la aguja y se empuja hasta llegar al tope. Se mueve el mango de la aguja para facilitar la realización del cilindro de parafina, hasta su extracción. Desechar el cilindro de parafina. Colocar el puente por encima del portabloques y, a continuación, el bloque de tejido donante sobre el mismo. El bloque de parafina receptor queda bajo el puente en la posición adecuada para introducir el nuevo cilindro.
5. Cambiar la posición de las agujas y pinchar el tejido del bloque donante.
6. Retirar el puente con el bloque donante.
7. Expulsar el cilindro de tejido exactamente encima del agujero realizado en la parafina, de forma que quede justo a nivel de la parafina sin hundirlo.
8. Cambiar las medidas del micrómetro, con el fin de hacer el siguiente agujero. En nuestro caso dejamos 1 mm de separación entre centro y centro de cada cilindro, con lo cual este milímetro sumado al milímetro del diámetro del cilindro nos dará un total de 2mm que tendremos de desplazar el micrómetro para realizar el siguiente *core*.
9. Proseguir con todos los cilindros hasta la finalización de la matriz tisular, siempre siguiendo el orden de colocación dado por la planilla que realizamos previamente.

2.4 Consolidación del bloque

Una vez terminada la matriz tisular, se introduce el bloque en una estufa a 37°C durante 12 horas aproximadamente. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los agujeros del *array* del bloque receptor. Sacamos el bloque receptor de la estufa y presionamos sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie. Se aplica una presión uniforme para empujar todos los cilindros del TMA a un mismo nivel. Dejamos

enfriar el bloque a temperatura ambiente antes de cortar.

2.5 Técnica inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 2 micras de grosor de cada matriz tisular, que se montaron sobre portaobjetos especiales para inmunohistoquímica de Dako (Referencia K8020).

Los anticuerpos ERG, P504S, PSMA, PSA, β -catenina, RA, E-cadherina, FAP Y p53, se introdujeron en el sistema automatizado PTLINK de Dako, que realiza de forma automática los pasos de desparafinación, rehidratación y desenmascaramiento antigénico. En el caso de la Topoisomerasa-II α se realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1. Desparafinación

- Se pusieron las preparaciones histológicas a 65°C durante un mínimo de 30 minutos.
- Se incubaron en un primer xilol durante 15 minutos y luego se realizaron pases rápidos por xilol limpio.

2. Rehidratación

- Lavar con alcohol absoluto
- Lavar con alcohol al 70%
- Lavar con alcohol al 50%.
- Lavar bien con agua y agua destilada.

3. Desenmascaramiento antigénico

A continuación, los anticuerpos ERG, P504S, PSMA, β -catenina, RA, E-cadherina, FAP y p53, como antes se ha comentado, se introdujeron en el sistema automatizado PTLINK de Dako con tampón comercial de Dako pH Alto (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)* (DM828) código K8000. Tampón Tris/EDTA concentrado 50 veces, pH 9. Para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada).

En el caso del anticuerpo PSA se utilizó tampón comercial de Dako de pH Bajo (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH* (50x) (código K8005). Tampón de citrato concentrado 50 veces, pH 6,1. Para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada).

El anticuerpo Topoisomerasa II α se incubó en tampón comercial de Dako con pH Alto (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH* (50x) (DM828) código K8000. Tampón Tris/EDTA concentrado 50 veces, pH 9. Para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada) durante 3 minutos a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.

Una vez realizada la descompresión del autoclave se dejaron enfriar las preparaciones en el tampón y después se lavaron con agua, agua destilada y por último con tampón TBS comercializado por Dako (*EnVision™ FLEX Wash Buffer* (20x) (DM831). Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20, concentrada 20 veces, pH 7,6 ($\pm 0,1$). Para su uso se realizó una dilución 1:20 con agua destilada).

En el caso del sistema automatizado PTLINK una vez acabado el ciclo se pasaron las preparaciones a TBS comercializado por Dako.

Todos los anticuerpos excepto la Topoisomerasa II α se introdujeron en el sistema de tinción automatizado *Autostainerlink 48* de Dako, siguiendo un protocolo similar al descrito a continuación para la Topoisomerasa II α .

Los pasos a seguir a continuación (bloqueo de la peroxidasa, incubación con anticuerpo primario, sistema de visualización, visualización de la reacción y tinción de contraste) se realizan mediante el kit *ENVISION FLEX (k8000)* suministrados por Dako.

4. Bloqueo de peroxidasa endógena (Topoisomerasa II α)

Se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo de peroxidasa comercializada por Dako (solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante Referencia. S2023) durante 10 minutos.

No se bloquea el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica ya que gracias a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos de Dako utilizados no es necesario (según recomendaciones de la propia casa comercial).

El resto de anticuerpos siguió el protocolo automatizado.

5. Incubación con anticuerpo primario

- Lavar 3 veces con PBS o TBS
- Se diluyeron los anticuerpos puros (RA, Topoisomerasa II α y FAP) en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako (*EnVision™ FLEX Antibody Diluent Ref. K8006*. Tampón Tris, pH 7,2 que contiene 15 mmol/L de NaN₃ y proteína, listo para su uso). Las concentraciones vienen dadas en la tabla para cada uno de los anticuerpos. El resto de anticuerpos se reciben prediluidos y listos para usar.
- La Topoisomerasa II α se incubó una hora a temperatura ambiente, el resto de anticuerpos siguió los tiempos del protocolo automatizado.

6. Sistema de visualización

- Lavar 3 veces con PBS o TBS
- En el caso de la Topoisomerasa II α se realizó una incubación con *ENVISION* durante 30 minutos (*Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007*). Para los restantes anticuerpos se utilizó el sistema de visualización *ENVISION FLEX* y los tiempos del protocolo automatizado.
- Lavar 3 veces con PBS o TBS en todos los casos.
- Lavar con agua destilada.

7. Visualización de la reacción

- Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones de Topoisomerasa II α durante 5 minutos en DAB (*Substrate Working Solution (CHROM)* suministrada por el kit *Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Código K5007*). El kit contiene un Frasco B (*Dako REAL™ Substrate Buffer*) con 250 mL de solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante, y un Frasco C (*Dako REAL™ DAB+ Chromogen*) con 5 mL de concentrado 50 veces tetrahidrocloruro de 3,3' diaminobencidina en disolvente orgánico. La solución *Substrate Working Solution*, que contiene DAB (*CHROM*), se prepara mezclando bien 20 μ L de *Dako REAL™ DAB+ Chromogen* (frasco C) y 1 mL de *Dako REAL™ Substrate Buffer* (frasco B). El sistema de sustrato produce un producto final marrón

claro en el lugar del antígeno diana.

- Parar la reacción lavando con agua destilada.

El resto de anticuerpos siguió el protocolo automatizado.

8. Tinción de contraste (Topoisomerasa II α)

- Se utilizó Hematoxilina 1 minuto.
- Se lavaron las preparaciones con agua corriente.

El resto de anticuerpos siguió el protocolo automatizado.

9. Deshidratación (para todos los anticuerpos)

Se realizó con pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.

10. Aclarado (para todos los anticuerpos)

Se realizó mediante pases en Xilol.

11. Montaje (para todos los anticuerpos)

Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan (medio de inclusión para microscopía de MERCK).

2.6 Valoración del patrón de tinción

Para la interpretación de los TMAs se realizó un estudio de todos los casos mediante el examen microscópico por dos patólogos de forma independiente, contrastándose los dos resultados y haciendo una media entre ambos valores. En aquellos casos en los que la calidad de la tinción o de la preparación no permitieron la correcta evaluación se etiquetaron como “no valorable” y se excluyeron del estudio, considerándose como caso perdido.

Tanto la intensidad como la extensión de la tinción fueron valoradas usando un sistema

de puntuación semicuantitativo, teniendo en cuenta el patrón de tinción característico para cada anticuerpo (según el prospecto de la casa comercial y la descripción del mismo en la literatura)²⁷⁹.

El criterio para la valoración de la intensidad de los marcadores demembrana y citoplasmáticos fue:

- 0: ausencia de tinción
- 1+: tinción débil
- 2+: tinción moderada
- 3+: tinción fuerte

El criterio para valoración de la extensión fue:

- 0: tinción inferior al 10% de las células
- 1+: tinción en menos del 25% de las células
- 2+: tinción entre 25-50% de las células
- 3+: tinción en más del 50% de las células

Ambas puntuaciones fueron sumadas, quedando una puntuación final de 0 a 6, considerándose positivo una puntuación igual o superior a 3.

En aquellos casos en los que se tratara de un marcador nuclear (RA, p53 y ERG), el sistema de puntuación utilizado es diferente, determinando el porcentaje de células positivas en 10 campos de gran aumento (X400).

En el caso del RA, se considera expresión positiva cuando su expresión en el núcleo celular está por encima del 50%²⁸⁰.

En el caso de la proteína p53 también se consideró una tinción positiva cuando se evidenció tinción de la misma fuera cual fuera la intensidad, pues observamos que eran muy pocos los casos que mostraban positividad para esta proteína²⁷⁹.

Por último, en el caso del ERG, en la literatura no hay especificaciones ni consenso en dónde establecerlo. Por ello lo que hicimos fue realizar una curva ROC la cual nos dio como mejor punto de corte el valor de 50%.

3. BIOLOGÍA MOLECULAR: GEN DE FUSIÓN TMPRSS2-ERG.

Tras la confirmación de la existencia de CaP en el bloque de parafina y selección de aquel que tiene mayor carga tumoral, se obtienen 3 cortes de 20 μm que introducimos en tubos Eppendorf para la realización de la biología molecular. El material que vamos a obtener de estas muestras es ARN mensajero (ARNm), y para ello previamente debemos desparafinar el tejido. Se realiza siguiendo el protocolo de aislamiento de ARN de la casa Ambion® (*Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*). A continuación, se describe el protocolo seguido²⁸¹.

3.1 Aislamiento de ARN (FFPE)

1. Poner el tejido (3 cortes de 20 μm) en un tubo de Eppendorf estéril.
2. Añadir 1000 μl de xilol. Vortear vigorosamente e incubar 3 minutos a 50°C.
3. Centrifugar a máxima velocidad 3 minutos.
4. Decantar el sobrenadante (con pipeta) sin tocar el pellet.
5. Repetir los pasos 2-4.
6. Añadir 1000 μl de etanol al 100% para quitar el xilol. Vortear.
7. Centrifugar a máxima velocidad 3 minutos.
8. Desechar el etanol con la pipeta.
9. Repetir el paso 6-8.
10. Incubar a 37°C hasta que el etanol se haya evaporado.
11. Resuspender el pellet en 200 μl de tampón proteasa (Digestion buffer).
12. Añadir 4 μl de Proteasa (a -20°). Vortear e incubar a 50°C durante 45 minutos vortearo ocasionalmente.
13. Vortear e incubar a 80°C 15 minutos vortearo ocasionalmente.
14. Añadir 240 μl de Isolation additive y vortear.
15. Añadir 550 μl de etanol 100% frío (-20°C) y mezclar bien con la pipeta.
16. Montar la columna de extracción, pasar 700 μl de la mezcla, centrifugar 30 segundos a 10000 rpm y desechar el líquido que queda en el tubo. No introducir en el tubo la parafina que se haya deshecho.
17. Repetir el paso 16 hasta haber pasado todo el líquido (2 veces).
18. El filtro de la columna se lava con 700 μl de Wash 1.
19. Centrifugar 30 segundos a 10000 rpm.

20. Eliminar el líquido.
21. Lavar con 500 µl de Wash 2/3.
22. Centrifugar 30 segundos a 10000 rpm.
23. Eliminar el líquido.
24. Dar un spin de 20 segundos para acabar de secar la columna.
25. Preparar el mix para la digestión enzimática con ADNasa (4µl de ADNasa a -20°C, 6 µl de Tampón 10X ADNasa, 50 µl de agua libre de ARNasa).
26. Añadir 60 µl a la columna e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
27. Lavar con 700 µl de Wash 1.
28. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
29. Centrifugar 30 segundos a 10000 rpm.
30. Eliminar el líquido.
31. Lavar con 500 µl de Wash 2/3.
32. Centrifugar 30 segundos a 10000 rpm.
33. Eliminar el líquido.
34. Repetir los pasos 31-33.
35. Pasar la columna a un tubo limpio y añadir 30 µl de agua libre de ARNasa.
36. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
37. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.
38. Repetir la elución con otros 30 µl (60 µl totales).
39. El ARN obtenido se mantiene en congelador, a -80°C.

3.2 Cuantificación de la concentración de ARN

A continuación, cuantificaremos la concentración de ARNm obtenida mediante el uso de un espectrofotómetro, en concreto con el NanoDrop® ND-1000 (*ThermoFisher Scientific*®), midiendo la absorción de luz ultravioleta (UV) con una longitud de onda de 260 nm. Este tiene un espectro total de 220-750 nm y mide concentraciones de ácidos nucleicos con 1 µl de muestra con exactitud. Tiene la capacidad de medir muestras muy concentradas, sin necesidad de diluirlas.

Para realizar la medición seleccionamos ARN en el programa, realizamos el blanco con agua libre de ARNasa. A continuación introducimos 1,5 μ l de ARN de cada muestra realizándose la medición de forma automática.

En la Figura 10 se observa la cuantificación de una muestra FFPE con el ND-1000.

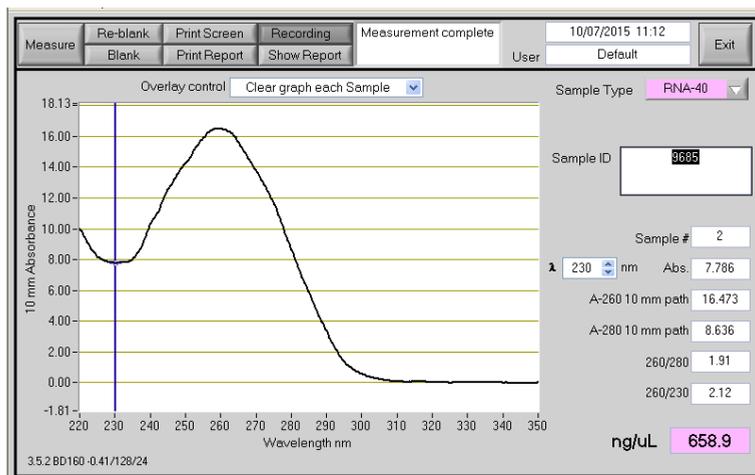


Figura 10: Curva de absorbancia de una muestra de ARN obtenida de material FFPE en el ND-1000. Se pueden apreciar, además de la cuantificación, los ratios de absorbancia.

Además, para evaluar con precisión la calidad de la muestra existen dos ratios que debemos tener en cuenta que son el 260/280 y 260/230. El balance 260/280 proporciona información sobre la presencia de proteínas y el 260/230 sobre el contenido en sales de la muestra. No obstante, debido a la fragmentación que sufre el ARN durante la fijación con formaldehído e inclusión en parafina (FFPE), esta medida espectrofotométrica es una estimación.

Para el ARN la ratio 280/260 debe estar por encima de 2, relaciones de pureza inferiores pueden indicar la presencia de proteínas, contaminantes u otros componentes que absorben fuertemente a 280 nm. El índice de pureza 260/230 debe estar entre 1,8 y 2,2 (si no es así puede tener influencia sobre la actividad polimerasa). Relaciones de pureza inferiores a los valores esperados pueden indicar que la técnica de aislamiento utilizada puede requerir una mayor optimización (Figura 11). Para estos casos se realiza un protocolo de purificación de la

muestra para concentrar y purificar el ARN.

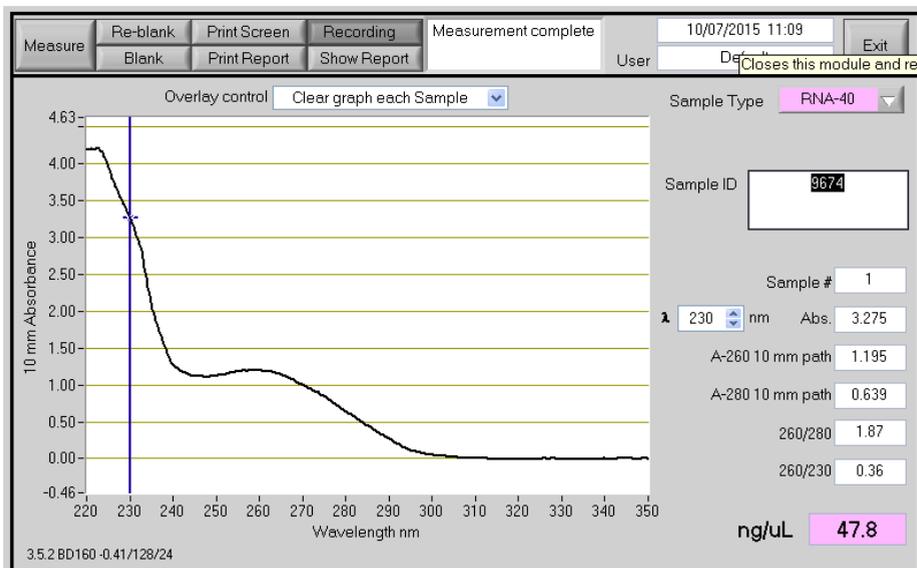


Figura 11: Curva de absorbancia de una muestra de ARN obtenida de material FFPE en el que se pueden apreciar la presencia de sales en la muestra.

3.3 Protocolo de purificación del ARN

El protocolo de purificación utilizado fue el siguiente:

1. Partimos de 60 μL de ARN (si tenemos menos, diluir hasta 100 μL con TE low EDTA).
2. Añadir en el siguiente orden:
 - 1 μL de glicógeno (Carrier). Resuspender con pipeta (no vortex).
 - 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,2 (10 μL). Resuspender con pipeta (no vortex). Importante que el pH del acetato de sodio sea el correcto.
 - 2,5 volúmenes (250 μL) de etanol absoluto frío (guardado en el congelador a -20°C). Mezclamos bien invirtiendo el tubo varias veces.
3. Dejar precipitar con una de las dos opciones:
 - O/N a -20°C
 - 1-2 horas a -80°C
4. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.
5. Decantar, sin perder de vista el pellet.
6. Lavar el pellet añadiendo 250 μL de etanol 70% frío (-20°C). No resuspender.

7. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm.
8. Decantar sin perder de vista el pellet.
9. Sacar los restos del etanol con una punta de pipeta.
10. Dejar secar a temperatura ambiente con el eppendorf boca abajo, unos 20 minutos (hasta que el pellet de ARN sea vea transparente).
11. Resuspender el pellet con el buffer TE Low EDTA o H₂O. Resuspender con pipeta.
12. En función del tamaño del pellet de ARN, añadir más o menos volumen (mínimo unos 20 µl hasta unos 60 µl)
13. Cuantificar la muestra con el Nanodrop para conocer la concentración y las ratios A₂₆₀/A₂₈₀ (>1,6-2), A₂₆₀/A₂₃₀ (>1,5).

El ARN obtenido se mantiene en congelador, a -80°C, hasta el momento de realizar el siguiente paso, la transcripción reversa.

3.4 PCR Cuantitativa en Tiempo Real

La RT-PCR cuantitativa es uno de los métodos que más se emplean para la detección de translocaciones en muestras clínicas. En nuestro estudio, el objetivo es determinar si existe un transcrito específico resultante de la fusión entre dos genes.

La RT-PCR consta de dos pasos; en el primero se usa la transcriptasa inversa (RT), una enzima que sintetiza ADNc a partir de ARN. En un segundo paso se amplifica el ADNc proveniente de nuestro transcrito diana llevando a cabo una PCR cuantitativa con sondas de hidrólisis o sondas Taqman específicas de los exones que flanquean los puntos de rotura de la translocación en estudio.

3.4.1 Transcripción reversa

La transcripción reversa consiste en la obtención de cadenas de ADN complementario (ADNc) a las monohebras de ARN que hemos extraído de las diferentes muestras. La técnica se basa en la capacidad que mostraron ciertos virus cuyo material genético es ARN, de convertir éste en ADN gracias a una ADN polimerasa ARN dependiente. Esta técnica nos permite obtener el ADNc de los mensajeros de ARN correspondientes a los genes que se

están expresando en el momento en el que recogimos las muestras. Para la síntesis del ADNc se usa el *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems®). Éste utiliza como polimerasa la *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, una transcriptasa reversa recombinante, procedente del virus de la leucemia murina de Moloney (rMoMuLV). El kit está optimizado para realizar la retrotranscripción en un volumen total de 20 μL y permite convertir hasta 2 μg de ARN en ADNc. El procedimiento seguido es el siguiente:

1. Descongelar las muestras en hielo.
2. Cuantificar con NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisher Scientific) justo antes de la retrotranscripción para ajustar la cantidad de ARN en cada muestra .
3. Preparar disoluciones de 10 μL de cada muestra de ARN en agua libre de ARNsas para obtener la misma concentración en todas ellas (200 ng totales).
4. Preparar 10 μL de RT master mix al 2x con los reactivos proporcionados en el kit, con los volúmenes que se reflejan en la Tabla 8 por cada reacción que vayamos a realizar. Mezclar bien y poner en hielo.
5. Añadir 10 μL de ARN muestra a cada reacción, mezclar bien y centrifugar brevemente para que bajen todos los componentes de las paredes del tubo.

Tabla 8: Composición de la mezcla necesaria para obtener ADNc desde ARN. A este volumen se le añadirán 10 μL de la disolución adecuada de ARN.

Reactivo	Volumen (μl) por reacción	Concentración final
RT Buffer	2,0	10 \times
dNTPMix (100 mM)	0,8	25 \times
RT randomprimers	2,0	10 \times
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (20 U/ μl)	1,0	20 U
Inhibidor de ARNsas (50 U/ μl)	1,0	50 U
Agua libre de ARNsas	3,2	-
Total por reacción	10	-

6. Programar el termociclador con el programa adecuado (Tabla 9) e introducir los tubos de reacción en el mismo (Applied Biosystems modelo Mastercycler ProS). El termociclador es un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces.

Tabla 9: Programación del termociclador para el proceso de RT

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

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

Es conveniente, antes de proseguir manipulando el ADNc, comprobar la eficacia de la etapa anterior. Así, para verificar que la transcripción reversa ha transcurrido con éxito, es adecuado realizar también a modo de control interno una PCR de un gen que se exprese constitutivamente. Los genes más utilizados como controles endógenos son: rRNA 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina, entre otros. En el presente estudio hemos utilizado la PCR del gen 18S.

3.4.2 Cuantificación relativa por PCR a tiempo real

El siguiente paso es analizar el nivel de expresión del transcrito producido por la fusión TMPRSS2/ERG mediante PCR cuantitativa (qPCR) o a tiempo real (RT-PCR).

La qPCR es una variación de la PCR estándar (ver PCR estándar en apartado 2.5.1) utilizada para la cuantificación de ADN o ARN. Utilizando cebadores específicos de una secuencia es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN. Existen básicamente dos estrategias de cuantificación: absoluta y relativa.

- La cuantificación absoluta necesita de una curva de calibración hecha con un estándar homólogo con el ADN blanco, y se expresa como copias por μL o como unidades de concentración.
- La cuantificación relativa: en esta se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto del estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico. En este caso si la

cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc y no a cambios en su expresión.

En nuestro caso empleamos la modalidad de qPCR relativa.

Para la cuantificación, se mide en cada ciclo la cantidad de amplicón producido y un amplicón no es más que la secuencia amplificada. Esta cuantificación es posible gracias a la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de una forma cuantitativa, de forma que a mayor producto de amplicón mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de qPCR detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Para esta reacción utilizamos los siguientes componentes:

- El ADNc que queremos valorar
- La Taq Polimerasa: a enzima responsable de la síntesis de las nuevas cadenas (en nuestro estudio la *TaqMan Gene Expression Master Mix*)
- La pareja de cebadores (o *primers*)
- Un oligonucleótido que contiene un fluoróforo (o *reporter* en su extremo 5', que se intercala en el surco menor del DNA) y un inhibidor de la fluorescencia (o *quencher*, en 3' de la cadena)

Cuando se desarrolla la polimerización a partir de los cebadores, la TaqMan® polimeriza de 5' a 3' y cuando encuentra el oligonucleótido unido al molde de ADNc su actividad 5' exonucleasa lo hidroliza, separando al *reporter* del *quencher*, y permitiendo así que se libere la fluorescencia (Figura 12).

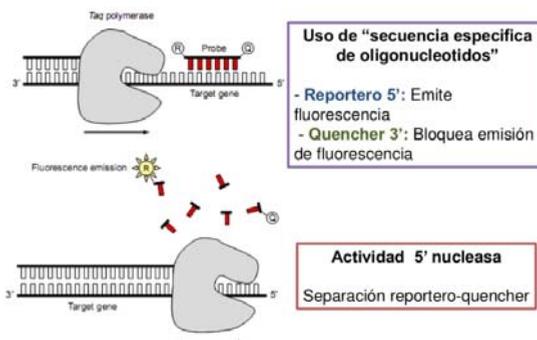


Figura 12: Sistema de detección específico TaqMan.

La PCR cuantitativa en tiempo real, se realizó en placas multipocillo de 384 pocillos, con tapas ópticas, y se utilizó el sistema ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems®) para la reacción, que se realizó utilizando una mezcla de reactivos que se detalla en Tabla 10.

Tabla 10: Mezcla de reactivos para la PCR cuantitativa.

Componentes	Volumen (μ l) por reacción
TaqManGene Expression Master Mix	5
20× cebadores-sonda	0,5
Agua libre de ARNsas	3,5
ADNc ¹	1
Total por reacción	10

¹El ADNc procede de la retrotranscripción de 200 ng de ARN totales.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se optó por la utilización del gen 18S como control interno (gen de referencia) en cada muestra. Al gen de referencia se le realizó en idénticas condiciones los mismos ensayos que al gen de fusión. El análisis de los valores de fluorescencia fue interpretado con el software RQ Manager (Applied Biosystems), y los cálculos se realizaron con hojas de cálculo en Excel (Microsoft Office, Madrid, España).

Los cebadores utilizados fueron todos *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystem®) que contienen la secuencia del cebador más el MGB (minor groove binding)

que es el oligonucleótido, marcado con FAM como fluoróforo. Las referencias se muestran en la Tabla 11. El programa para el procesamiento de la información fue SDS 2.4 (Applied Biosystem®) con el programa de temperaturas y ciclos en modo “Standard”, que consiste en:

- 2 minutos a 50°C
- 10 minutos a 95°C
- 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C

Tabla 11: Descripción de cebadores, referencia del fabricante y su función en la reacción.

Gen	Referencia	Función	Tamaño (pb)
18S	Hs_99999901_s1	Gen referencia	187
TMPRSS2-ERG fusión	Hs_03063375_ft	Transcrito en estudio	106

El caso se consideró positivo cuando había amplificación de la fusión en las dos réplicas. En el caso de que sólo una réplica fuese positiva se repitió el estudio utilizando tres réplicas. Finalmente se consideró positividad de la muestras siempre cuando dos de las tres réplicas produjesen amplificación (Figura 13).

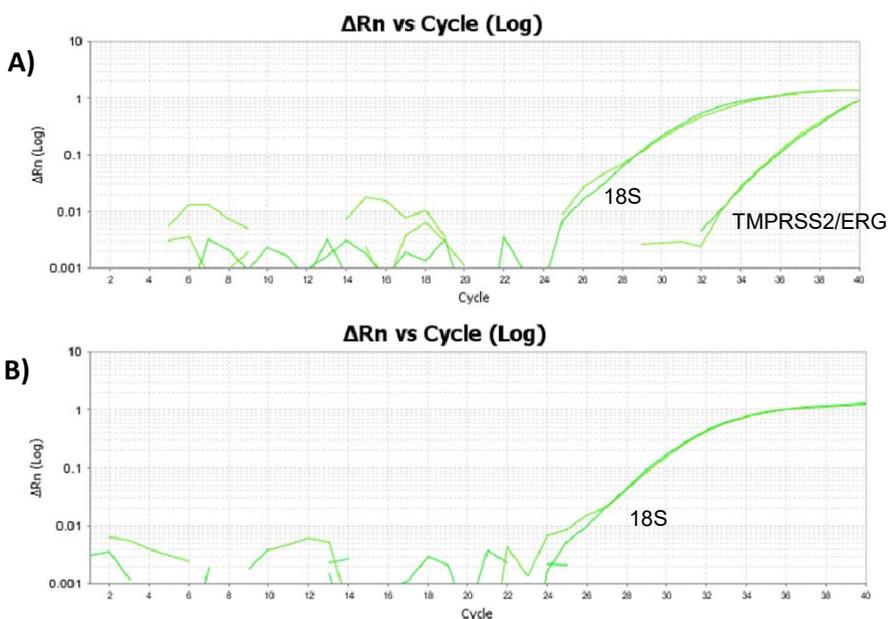


Figura 13: **A)** Caso con presencia de la fusión TMPRSS2/ERG. **B)** Muestra con TMPRSS2/ERG negativa.

3.4.3 Método de cuantificación

Existen principalmente dos métodos de cuantificación, dependiendo de si la eficiencia de la amplificación del gen objeto del estudio y el gen de referencia son comparables:

- Método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$: se comparan directamente los valores del ciclo umbral (C_t) del gen testado y los valores C_t del gen de referencia (ΔC_t) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔC_t de la muestras experimental con respecto a la muestra control. Para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares. 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.
- El otro método se basa en la utilización de una recta estándar a partir de ADNc de concentraciones conocidas, y extrapolar la concentración del gen en la muestra experimental a partir del C_t obtenido. Posteriormente se calcularía la relación entre la cantidad del gen testado y el gen de referencia, y se compararía dicha relación entre las muestras.

En nuestro estudio hemos utilizado el método de cuantificación del $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para ello se ha requerido del termociclador ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystem) el cual proporciona los valores de fluorescencia detectados por la amplificación del ADNc, como se puede apreciar en las curvas proporcionadas (Figura 14). Con el programa RQ Manager (Applied Biosystem) se elimina el ruido de fondo mediante el establecimiento del *Threshold*, y así, el programa extrae los valores correspondientes de C_t para cada muestra. El C_t es el ciclo en el que la amplificación del ADNc proporciona una intensidad de fluorescencia suficiente y comparable, y que se adecua a cada placa de muestras valoradas.

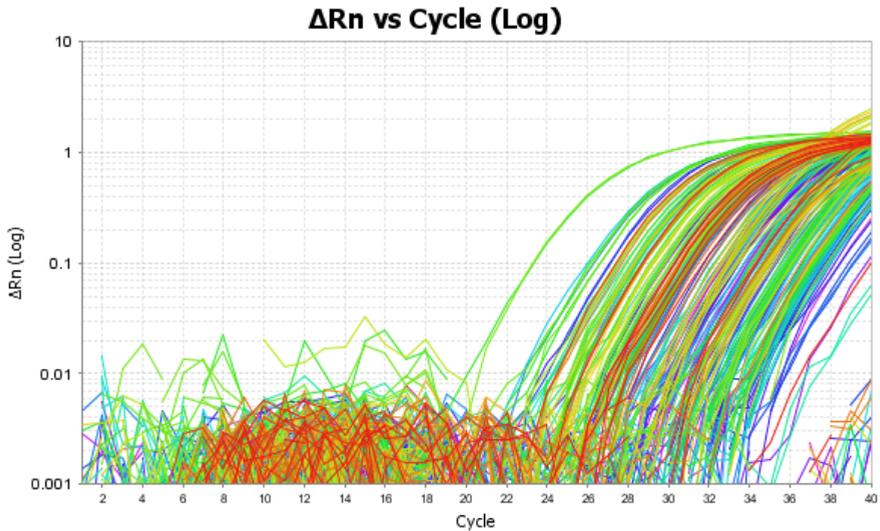


Figura 14: Gráfico proporcionado por el programa *Expression Suite Software* v1.0.1 (Applied Biosystem), representa la variación de fluorescencia con respecto al ciclo de amplificación.

3.5 Secuenciación

Con el objeto de corroborar los resultados obtenidos por PCRq se utilizó la técnica de PCR cualitativa (RT-PCR) como segundo método de determinación y posteriormente la secuenciación. Para ello se escogieron 80 muestras al azar y se procedió a realizar su estudio.

Se verificó que la calidad del ARN de las muestras y que la transcripción reversa había transcurrido con éxito realizando una PCR de un gen que se expresa constitutivamente (β 2microglobulina).

Los pasos realizados fueron los siguientes:

- Técnica de la PCR: amplificación de la fusión Tmprss2 exón 1/ERG exón 4 y del gen constitutivo β 2 microglobulina
- Purificación de los productos de PCR (tratamiento del producto de PCR con Exonucleasa I y SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)
- Reacción de secuenciación
- Purificación de la reacción de secuenciación
- Secuenciación y análisis de las secuencias en la base de datos.

3.5.1 Técnica de la PCR

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como diana (*target*) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como cebadores (o *primers*). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.

Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente (Figura 15). La PCR se lleva a cabo en un termociclador. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

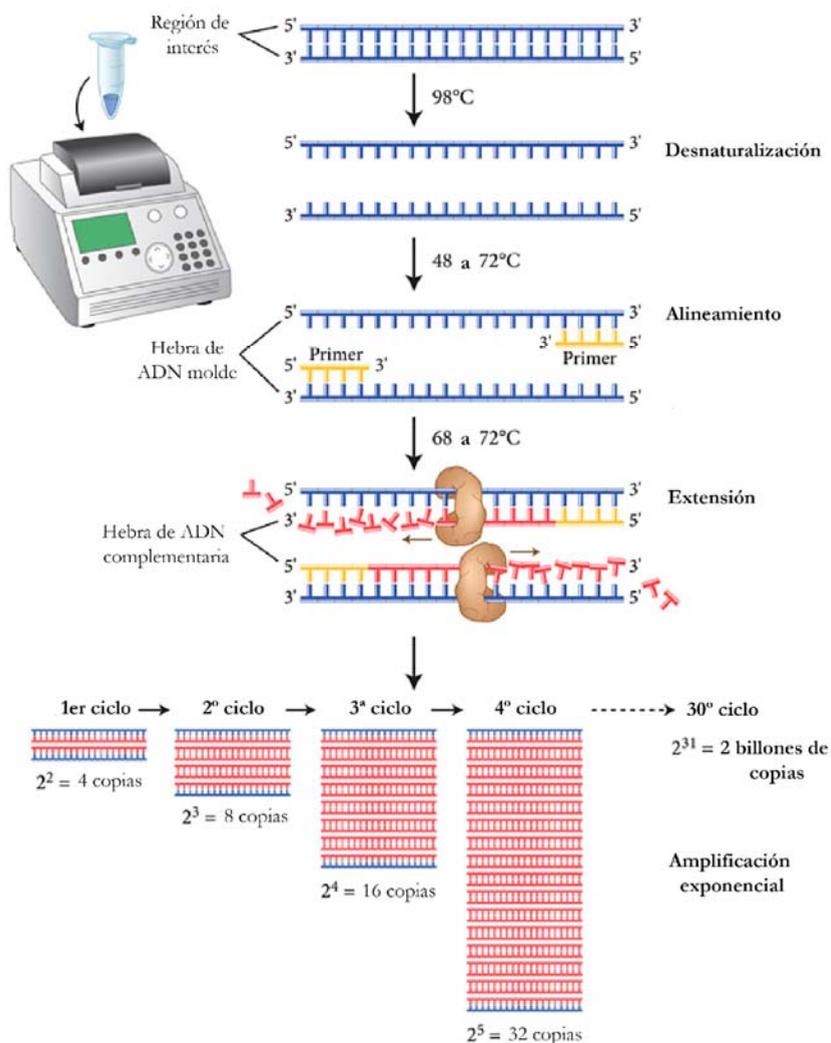


Figura 15: Pasos de la técnica de PCR.

En las Tablas 12, 13 y 14 se especifican las condiciones de reacción, amplificación y cebadores empleados para llevar a cabo la PCR convencional de detección del transcrito de fusión y del gen constitutivo $\beta 2$ microglobulina:

Tabla 12: Mezcla de reacción para llevar a cabo la PCR convencional.

Componentes	Volumen por reacción (μL)	Concentración final
AmpliTaQ Gold 360 Master Mix (AppliedBiosystems)	12,5	2 \times
Primer Forward (15 μM)	1	0,6 μM
Primer Reverse (15 μM)	1	0,6 μM
Agua libre ARNsa	8,5	-
ADNc (200 ng de ARN total)	2	-
Volumen final	25	-

Para realizar esta PCR se empleó el termociclador de Eppendorf Mastercycler proS.

Tabla 13: Condiciones para la PCR cualitativa

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min.)	Ciclos
95	10	1
94	1	38
60	1	38
72	1	38
72	10	1

Tabla 14: Secuencias de primers para la amplificación de la fusión TMPRSS2-ERG exón 4 y de la β_2 microglobulina.

Primer	Secuencia (5'-3')	Nombre amplicón	Producto amplificado
TMP-1.RF	TAGGCGCGAGCTAAGCAGGAG	TMPRSS2-ERGexón4	124 pb
ERGP1.RR	GTAGGCACACTCAAACAACGACTGG		
MGBR.RF	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCT	β_2 microglobulina	111 pb
MGBR.RR	TGTCGGATTGATGAAACCCAG		

El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, previamente cargado con las muestras de interés y controles, bajo un campo eléctrico de 120V durante 40 min. (Anexo 2).

Cargamos una alícuota de la reacción en un gel de agarosa al 2% con RedSafe (ChemBio), en transiluminador UV. Se comprueba el tamaño esperado, su intensidad, la

ausencia de amplificaciones inespecíficas, la ausencia de dímeros de cebadores y la ausencia de señal en las reacciones utilizadas como control negativo (sin ADN molde).

3.5.2 Purificación de los productos de PCR

Una vez verificada la obtención del producto de PCR, cualquier resto de nucleótidos no consumidos y/o cebadores remanentes en el producto de PCR debe ser eliminado, al poder interferir en la posterior reacción de secuenciación.

Esta purificación se lleva a cabo con el producto ExoSAP-IT (Amersham-Biosciences) que utiliza dos enzimas hidrolíticas, la Exonucleasa I y la Fosfatasa Alcalina para eliminar esos restos no deseados y preparar el producto de PCR para el siguiente paso. A pesar de que el protocolo comercial indica volúmenes mayores, las siguientes indicaciones han dado resultados satisfactorios reduciéndolo en gran medida. Añadir 1 μL de ExoSAP-IT (USB) en 5 μL de producto PCR. Luego, en un termociclador incubar a 37°C durante 15 min., seguido de un paso final a 80°C durante 15 minutos.

3.5.3 Reacción de secuenciación

Una vez tenemos el producto de PCR purificado, se lleva a cabo la reacción de secuenciación en la que las bases nucleotídicas, de las secuencias amplificadas, quedan marcadas con fluorescencia para poder ser detectadas en el secuenciador. Para ello el kit comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems) ofrece resultados satisfactorios. A pesar de que el fabricante indica un protocolo a seguir con unos volúmenes específicos que aseguran el correcto funcionamiento de los reactivos, la modificación de los protocolos del fabricante funciona siempre correctamente, consiguiendo reducir drásticamente el volumen del Big Dye.

Para realizar la reacción de secuenciación hay que preparar el mix detallado en la Tabla 15 (mezcla de componentes por cada reacción de 10 μL) y programar el siguiente perfil de PCR en un termociclador: 96°C, 1 min./ (96°C, 10 seg./ 55°C, 5 seg./ 60°C, 4 min.) x 36 ciclos.

Tabla 15: Mezcla de componentes para secuenciación.

Componentes	Cantidad (μL)
5X	1,5
BigDye	0,5
Template	1-5
Primer (3,2 pmoles/ μL)	1
Agua	-
Volumen final	10

3.5.4 Purificación de la reacción de secuenciación.

La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit comercial Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio).

Procesamos los productos de PCR pasándolos por columnas de purificación. Centrifugar las columnas de purificación (Edge Biosystems) 3 minutos a 3000 rpm y descartar el eluido. Poner la columna en un nuevo tubo tipo eppendorf. Pipetear todo el producto de secuenciación (10 μl) dentro de la columna. Volver a centrifugar 3 minutos a 3000 rpm.

3.5.5. Secuenciación y análisis

En nuestro caso, el servicio de Anatomía Patológica de la Universidad de Valencia dispone de un secuenciador automático Applied Biosystem 310, que se basa en el método de secuenciación de Sanger. El análisis de los electroferogramas obtenidos se llevó a cabo con el software Analysis sequencing v 5.1.1 de ABI.

Los cromatogramas obtenidos se alinearon frente a la siguiente secuencia consenso:

TMPRSS2-ERG exón 4 (GenBank: DQ204772.1)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/DQ204772.1>);

**CTAGGCGCGAGCTAAGCAGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGGCGAGGGGCGG
GGAGCGCCGCTGGAGCGCGGCAGGAAGCCTTATCAGTTGTGAGTGAGGACC
AGTCGTTGTTTGAGTGTGCCTAC**

4. ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL ADN

4.1 Análisis de la metilación del gen *PITX2*

Para nuestro estudio de la metilación del ADN hemos seleccionado el gen *PITX2* (ID: 5308, NC_000004.12). La región diana en la que se ha realizado el estudio de metilación está localizada en el dominio del gen *PITX2* localizado en **chr4:111538580-111565079**. Nuestro estudio se centró en evaluar la metilación de la región promotora en sitios con alta densidad de islotos CpG. La región que seleccionamos rica en CpGs en la posición del cromosoma 4 es: 111542063-111544464 (2401 bp), localizada en la banda 4q25 y con un conteo de 196 CpGs y un ratio observado de CpG de 0.8. (Figura 16).

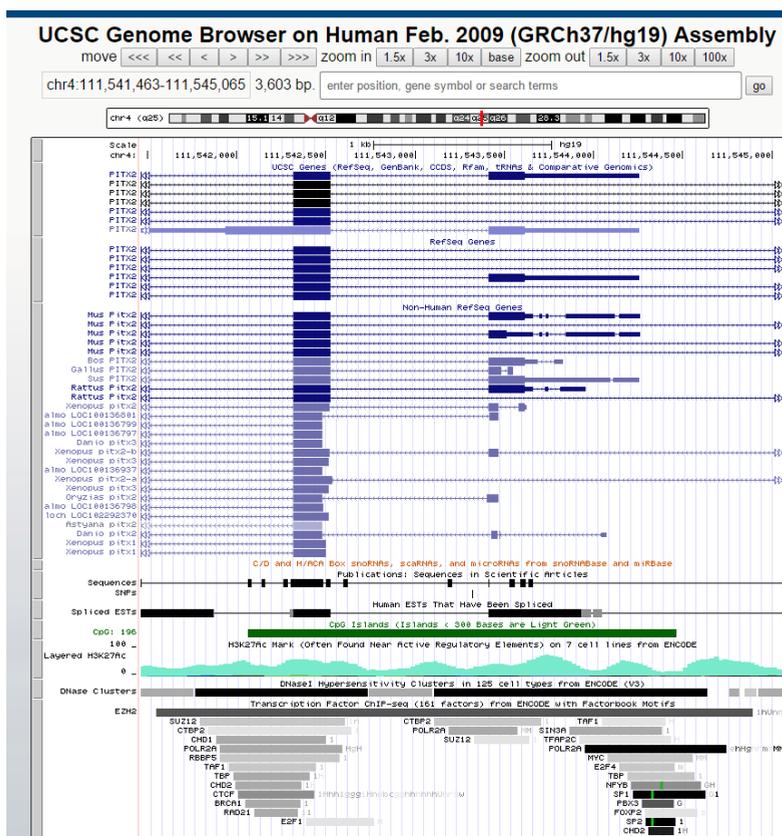


Figura 16: Región analizada del gen *PITX2* para el estudio de metilación.

4.2 Epytyper (Sequenom)

El estudio de la metilación de un gen único puede realizarse mediante una técnica basada en la conversión del ADN mediante el método del bisulfito y posterior análisis mediante espectrometría de Masas MALDI-TOF. Siguiendo esta estrategia, la tecnología *EpyTYPER by Sequenom* es uno de los procedimientos más sensibles y optimizados y también se recomienda para estudios en un único gen en aplicaciones clínicas. EpyTYPER consiste en un tratamiento del DNA con bisulfito seguido de una reacción de PCR en la cual se introduce una etiqueta T7 de la polimerasa. Tras este paso, se realiza una transcripción in vitro con la polimerasa T7, seguido de una rotura específica en uracilos generada por la ARNasa A. Esta rotura produce fragmentos de diferente tamaño que depende de la presencia original de las citosinas metiladas²⁸²(Figura 17).

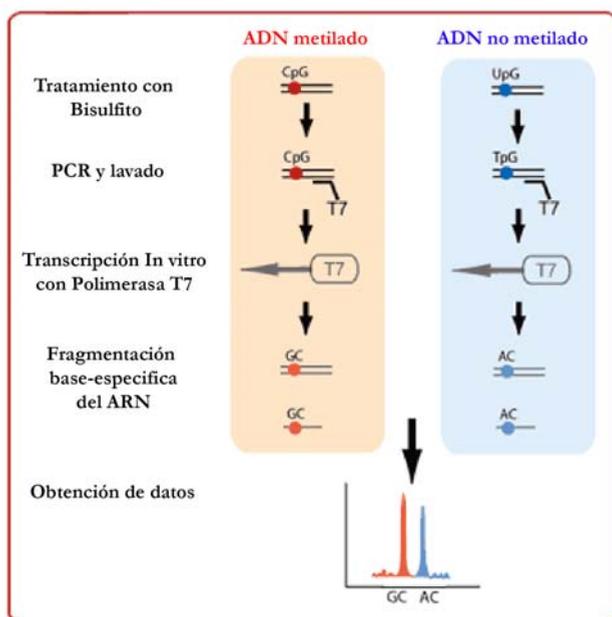


Figura 18: Proceso seguido para el estudio de la metilación del ADN según la metodología Sequenom (esquema obtenido de *Sequenom DNA methylation Analysis Protocol*).

4.3 Selección del amplicón

A continuación pasamos a identificar el amplicón que debemos seleccionar para el estudio. Para ello se accede a la web www.epidesigner.com y se obtienen los amplicones recomendados para el estudio de metilación de este gen²⁸³ (Figura 18).

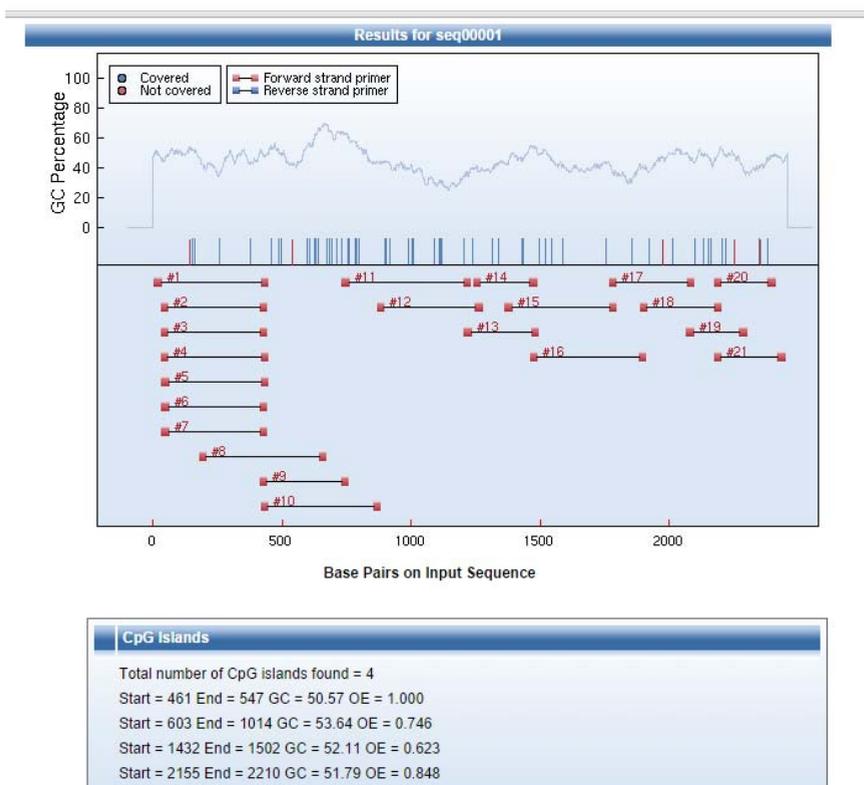


Figura 18: amplicones de la secuencia promotora del PITX2

Los amplicones recomendados son el 8, 11 y 15 tal y como se muestra en las figuras 19-21.

De los tres finalmente se selecciona el amplicón 15 para el estudio de metilación del gen PITX2, y en la misma página web se obtienen los primers específicos requeridos (Figura 22).

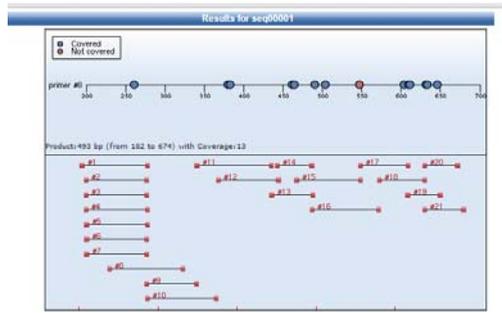


Figura 19: Representación del amplicón 8

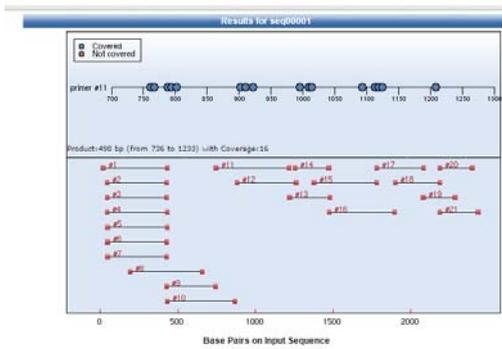


Figura 20: Representación del amplicón 11

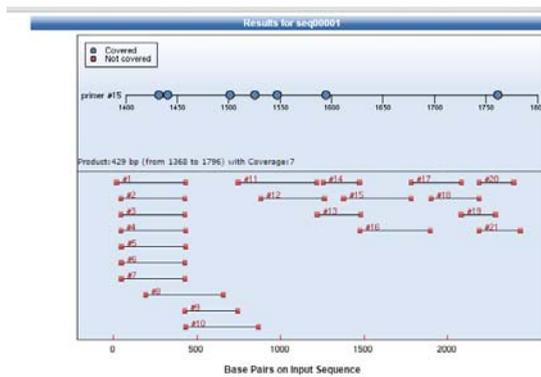


Figura 21: Representación del amplicón 15

15	LEFT PRIMER	1368	25	58.94	32	4	GAAATTGTTTGTAGGGTTGAGATT
	RIGHT PRIMER	1796	25	60.66	32	5	AAAACATTAAACCATTTCCTTCACC
PRODUCT Size: 429, No of CpG's : 7, Coverage : 7							

Figura 22: Primers para el estudio del amplicón 15

4.4 Metodología del análisis

Este ensayo requiere 1 µg de ADN a una concentración de 50 ng/µL (máximo 20 µL). Este ADN es convertido mediante el método de bisulfito utilizando el kit EZ kit de metilación del ADN (Zymo Investigación, Orange, CA) según las instrucciones del fabricante, este kit sigue el protocolo de Paulin et al. estandarizado en el 1998²⁸⁴.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en un volumen total de 5µL, 1 pmol de cada primer del gen de interés, 40 µM dNTPs, 0.1U Hot Star TaqDNA polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂ y buffer de PCR, con un paso de preactivación de 15 min a 95 °C, 45 ciclos a 95 °C de 20s, 62 °C durante 30 s y 72 °C 30 segundos seguido de un paso final de 72°C de 3 min. Los dNTPs no incorporados se defosforilan mediante la adición de 1,7 µL de H₂O y 0.3 U de fosfatasa alcalina (*Sequenom*, San Diego), durante 20 min a 37 °C y una posterior inactivación de 10 min a 85 °C.

A continuación, 2 µL de la reacción de PCR se utilizan junto con 20 U de la T7 ADN polimerasa, 1 mM dNTPs, según las instrucciones del fabricante. En el mismo paso se produce la transcripción in vitro de la ARNasa A (*Sequenom*, San Diego) que degrada en función del contenido en Uracilos, en un volumen final de 27 µL.

Finalmente 15 nL se dispensan con el robot en la matriz de silicio del SpectroCHIP® (*Sequenom* Inc, San Diego, CA) y analizados según el procedimiento del espectrómetro de masas MassARRAY (*Bruker-Sequenom*).

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis estadístico se recogieron todos los datos de las historias clínicas y los resultados de los estudios experimentales en una base de datos mediante el programa SPSS Versión 22.0.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) con el que también se realizaron los estudios estadísticos.

El análisis estadístico busca obtener relaciones entre las variables clínico-patológicas y los hallazgos de los estudios de expresión inmunohistoquímica, de biología molecular (fusión del gen *TMPRSS2*) y epigenética (metilación del gen *PITX2*). También evaluamos si las variables experimentales en estudio tienen valor predictivo respecto a la supervivencia libre de recidiva bioquímica.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con una significación del 0,05 y las estimaciones con un intervalo de confianza de 95%.

5.1 Estadística descriptiva

El análisis descriptivo inicial contiene los estadísticos básicos de las variables continuas: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana; así como distribución de frecuencias y porcentajes para las variables categóricas.

5.2 Estadística analítica

Se ha realizado un análisis bivalente que engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para evaluar la relación entre gen de fusión, la metilación del gen *PITX2* y los marcadores inmunohistoquímicos con las variables clínicas e histológicas.

Antes de comenzar el análisis, se ha comprobado la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) como prueba de ajuste a una distribución normal de las variables continuas del estudio. La aceptación de la normalidad permitiría la aplicación de pruebas de tipo paramétrico; mientras que la no aceptación determinará el uso de no paramétricas. Los contrastes realizados en este estudio son mediante las siguientes pruebas no paramétricas:

- Chi cuadrado (X^2): lo utilizamos para determinar si dos variables cualitativas están o no asociadas.
- Test exacto de Fisher: se ha utilizado en aquellos casos en que queremos analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña (<5) y no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación del test X^2
- Prueba de Mann-Whitney (M-W): utilizada para contrastar si la distribución de un parámetro continuo, es o no la misma en dos muestras independientes.
- Prueba de Kruskal-Wallis (K-W): la hemos aplicado para contrastar si la distribución de un parámetro continuo, es o no la misma en más de dos muestras independientes.
- Coeficiente de correlación de Spearman: utilizada para establecer si existe correlación entre dos variables continuas.

Además, se ha realizado un modelo multivariante que estima la relación o asociación entre dos variables teniendo en cuenta que puede haber otros factores que modifiquen esa relación, en concreto, un modelo de regresión logística binaria. Este se ha realizado para determinar qué variables se asocian a una mayor probabilidad de recidiva al año y a los 5 años de la cirugía en función de una serie de variables independientes.

5.3 Análisis de supervivencia

Análisis univariante

Se realizará análisis de supervivencia en base al tiempo de recidiva bioquímica por medio de la función de supervivencia de Kaplan-Meier aplicándose el test estadístico *log-rank*. Consideramos inicio del proceso la fecha de la prostatectomía radical y como final la fecha de la recidiva bioquímica si la hay, o el último seguimiento o exitus del paciente si no la hay. Se evalúa si las variables clínico-patológicas y los marcadores del estudio (marcadores inmunohistoquímicos, la presencia del gen de fusión y el grado de metilación del gen PITX2) implican una relación con supervivencia libre de RBq.

Análisis multivariante

Para en análisis multivariante de la supervivencia se ha utilizado el análisis de Regresión de Cox el cual permite modelizar la supervivencia en función de un factor o conjunto de factores independientes. Permite la estimación de parámetros relacionados con el riesgo de recidiva que tiene un paciente por tener unas determinadas características. Este modelo nos permite identificar los factores que influyen en el tiempo hasta la recidiva bioquímica desde un punto de vista multivariante de manera que se trata de una representación más fiable de lo que pasa en la realidad.

El método empleado para la incorporación de las variables es el de “selección hacia adelante (Wald)”. El p-valor del estadístico de Wald de entrada al modelo es de 0,05 y el de salida del mismo 0,1.

El Análisis de Cox exige establecer, para cada factor independiente, una categoría de referencia; ya que se va a comparar por cuánto se multiplica el impacto o tasa de riesgo si el paciente pertenece a una determinada categoría respecto a la de referencia. En el estudio, se ha considerado la 1ª categoría de cada factor como la de referencia, es decir, la de menor gravedad.

Se determinó si los marcadores inmunohistoquímicos, la presencia del gen de fusión o la metilación del gen PTX2 son variables predictoras, ajustadas por las variables clínico-patológicas. Consideramos como variable dependiente el tiempo en que se produce la recidiva bioquímica. La medida de efecto de cada variable se calculó a través del Hazard Ratio (HR) o riesgo relativo (RR).

RESULTADOS

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1 Variables clínicopatológicas

A continuación en la Tabla 16 se muestran las variables clínico-patológicas del estudio.

Tabla 16: Frecuencia de variables clínico-patológicas en la serie estudiada.

Variable clínico-patológica	Frecuencia N(%)	Variable clínico-patológica	Frecuencia N(%)
Edad (Media ± DE)	64 ± 5,4	Estadía je pieza	
PSA		T2	168 (78,9)
< 10	154 (71,6)	T3	45 (21,1)
10-20	52 (24,2)	Gleason pieza	
> 20	9 (4,2)	< 7	60 (28,4)
Estadía je clí nico		7	104 (49,3)
T1	148 (68,8)	> 7	47 (22,3)
T2	66 (30,7)	Invasión perineural	
T3	1 (0,5)	Sí	43 (20)
Gleason biopsia		No	172 (80)
< 7	127 (59,1)	Márgenes positivos	
7	71 (33)	Sí	83 (38,6)
> 7	17 (7,9)	No	132 (61,4)
Grupos de riesgo		Ganglios positivos	
Bajo	45,6	Sí	9 (4,2)
Intermedio	42,3	No	206 (95,8)
Alto	12,1	Recidiva bioquímica	
		Sí	79 (36,7)
		No	136 (63,3)

Observamos que existe un llamativo infraestadía je en el Gleason, mostrando un mayor grado las piezas de PR que los cilindros de la biopsia prostática (Figura 23). Además también es de reseñar que prácticamente todos los pacientes son estadios T1 o T2, ya que el estudio corresponde a una época donde los CaP a los que se indicaba cirugía era los clínicamente localizados, de ahí también que predominen los grupos de riesgo bajo e intermedio.

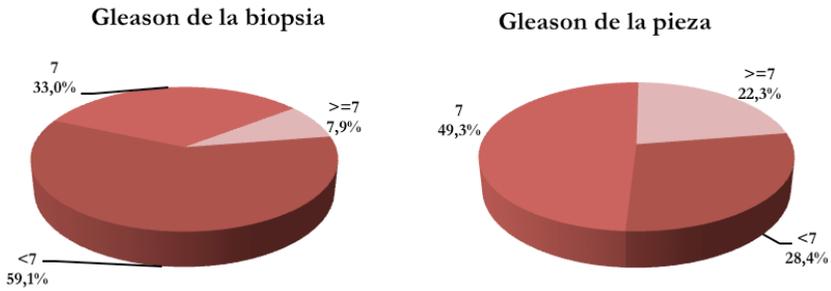
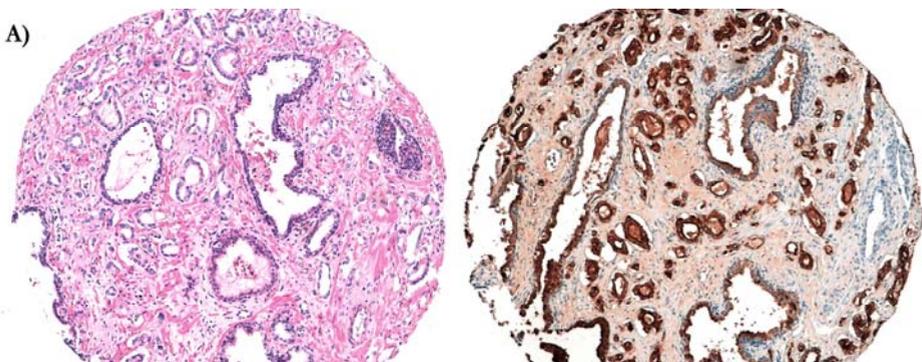


Figura 23: Infraestadaje de Gleason en biopsia prostática.

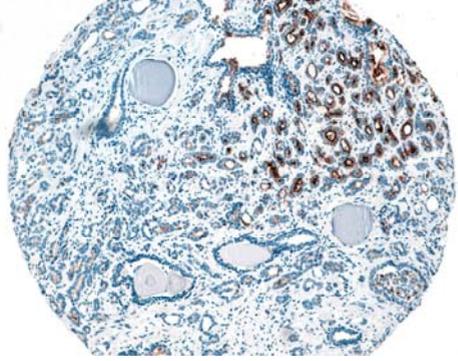
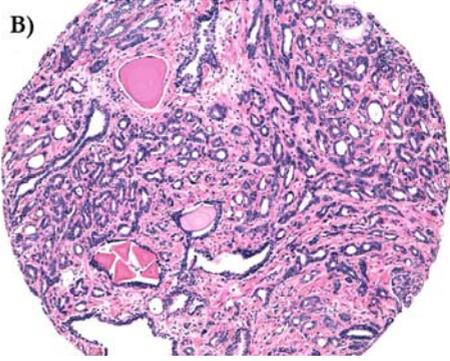
1.2 Marcadores inmunohistoquímicos

Para el estudio inmunohistoquímico se distribuyeron los pacientes en 6 matrices tisulares sobre los que se analizó la expresión de las proteínas FAP, PSA, PSMA, P504S (Racemasa), Topoisomerasa IIa, E-cadherina, β -catenina, p53, RA y ERG. Finalmente contamos con 201 casos, pues en 14 casos no fueron válidos por la mala calidad de la muestra.

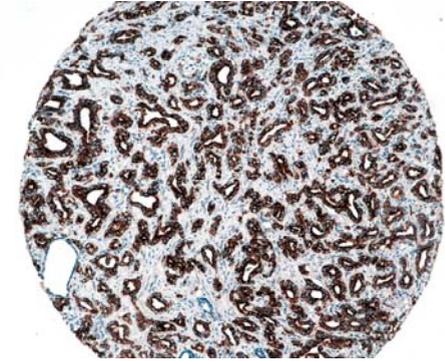
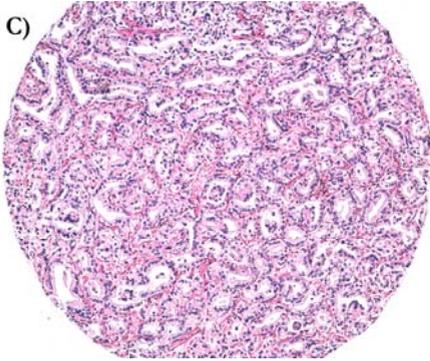
En la Figura 24 se pueden apreciar ejemplos de las tinciones IHQ de los marcadores proteicos estudiados en la presente tesis.



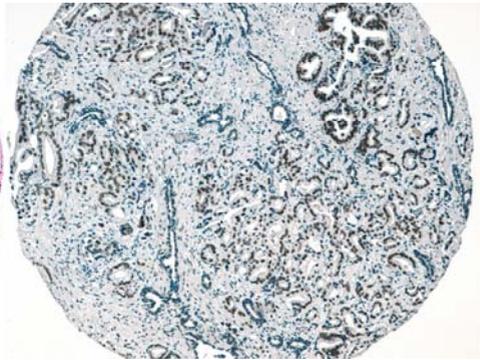
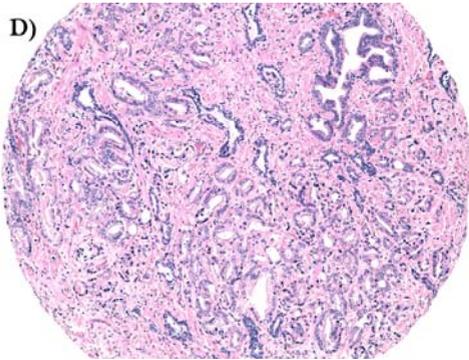
B)



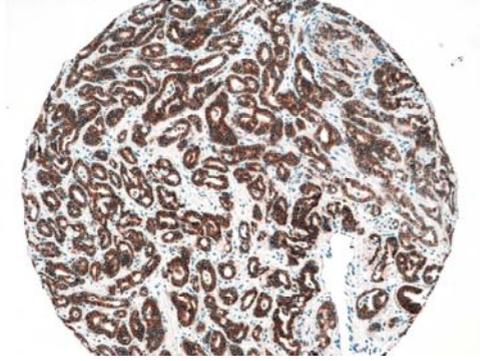
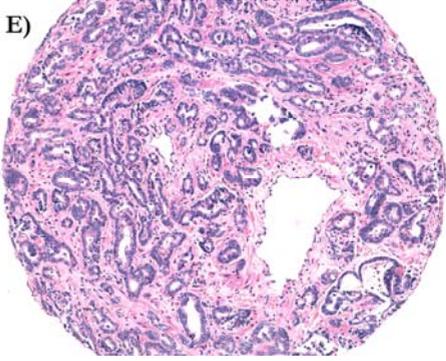
C)



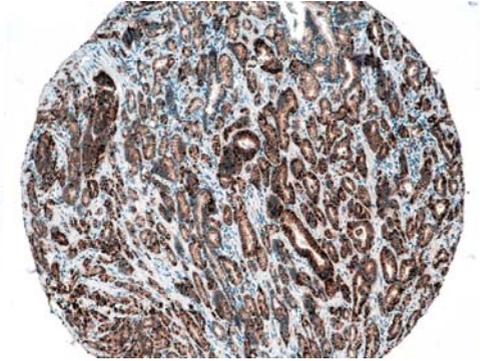
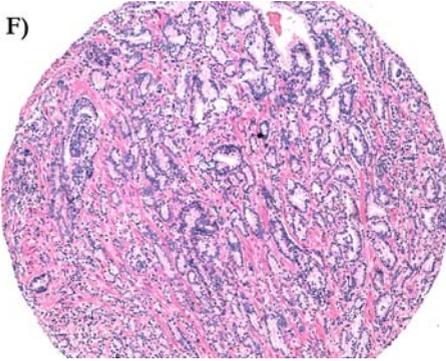
D)



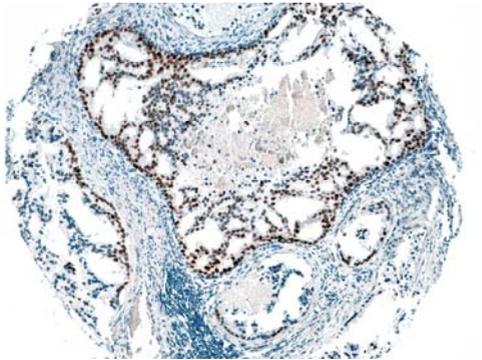
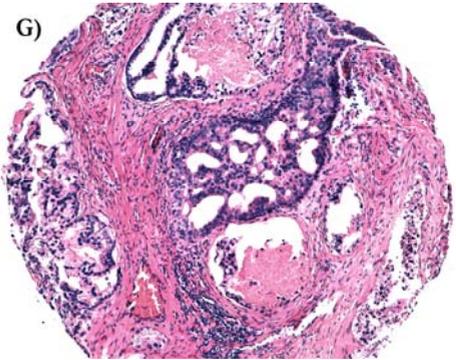
E)



F)



G)



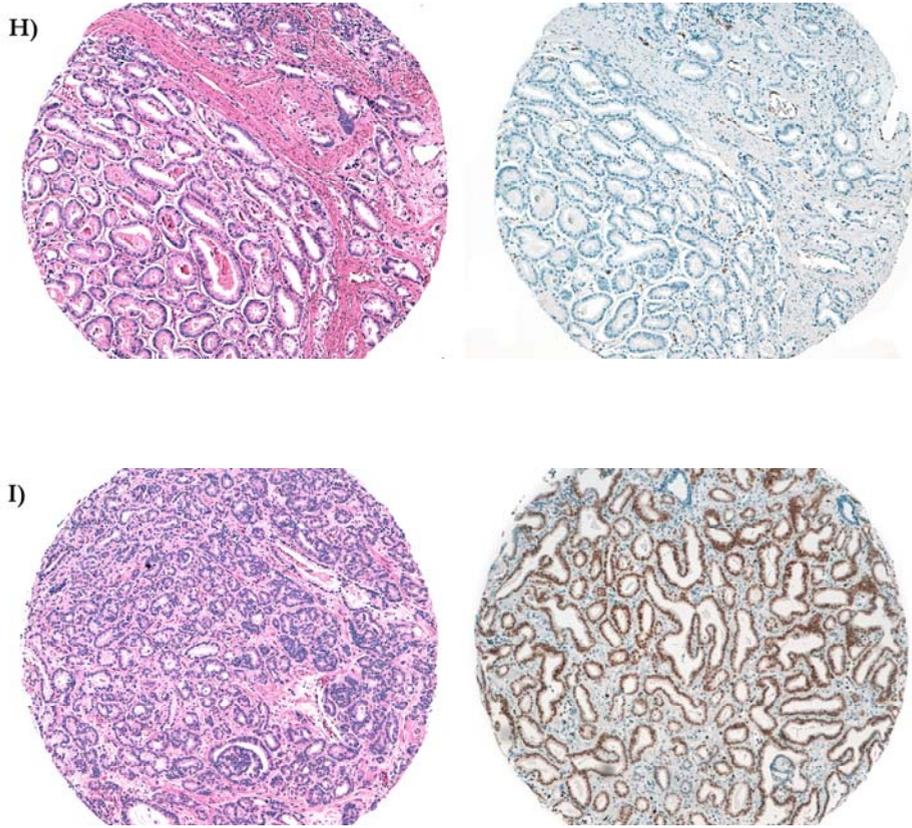


Figura 24: Inmunohistoquímica de diferentes marcadores estudiados, donde observamos en la izquierda la H-E y a la derecha la tinción IHQ. A: PSA, B:PSMA, C:Racemasa, D:RA, E: β -catenina, F:E-cadherina, G: p53, H: ERG negativo, I: ERG positivo.

De todos ellos el porcentaje de sobreexpresión en la serie de casos se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17: Frecuencia de positividad de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos.

Marcador	Expresión marcador (%)	
	Negativa	Positiva
ERG	64,1	35,9
P504S	57,7	43,3
PSMA	27,6	72,4
PSA	15,6	84,4
p53	80,5	13,5
β -catenina	39,2	60,8
RA	56,6	43,4
Topoisomerasa-II α	51	49
FAP	11,5	88,5
E-cadherina	8,5	91,5

Podemos observar que el marcador p53 se encuentra infraexpresado en las muestras de CaP, mientras que marcadores como la E-cadherina, la FAP, el PSA y PSMA están sobreexpresados. En el caso de la proteína ERG el porcentaje de expresión está por debajo de la mitad de los pacientes.

1.3 Determinación de *TMPRSS2-ERG* por qPCR.

De los 214 CaP analizados, 121 (56%) expresaron el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* determinado mediante PCR cuantitativa. (Figura 25)



Figura 25: Frecuencia expresión gen de fusión *TMPRSS2-ERG* qPCR

En la Figura 26 se pueden ver los diagramas en cajas con los Ct (ciclo umbral) obtenidos en el análisis de expresión del gen referencia y la fusión en estudio, lo que da una idea de la dispersión de los datos adquiridos.

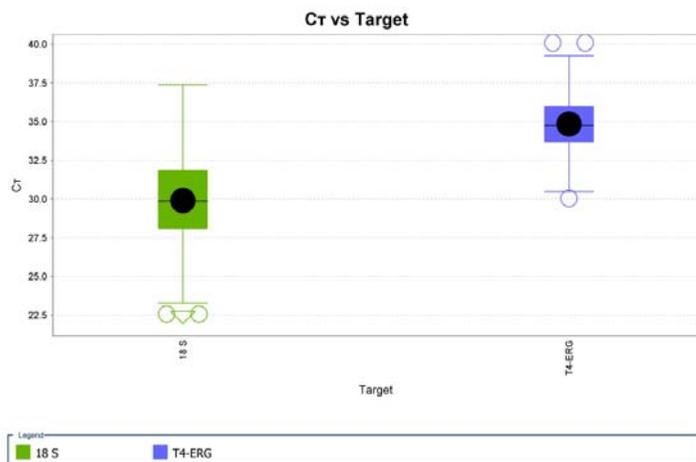


Figura 26: Diagrama de cajas en el que se representa Ct media para la fusión y gen control analizado. Se muestra la dispersión de los datos obtenidos. Los círculos negros representan el valor medio de Ct, mientras que la barra horizontal dentro de la caja corresponde al valor mediano de Ct. La barra 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. El triángulo invertido señala que el gen 18S presenta valores *outliers*.

PCR TMPRSS2-ERG

La coincidencia entre los resultados obtenidos por qPCR cualitativa y PCR fue del 95%. Los casos que no coincidieron eran falsos positivos, esto es debido a que al diseñar el producto 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) esta reacción es muy susceptible de contaminación aunque se extremen las precauciones durante la preparación de la PCR (campana con lámpara de rayos ultravioleta).

A continuación se muestra la electroforesis en gel de agarosa donde se puede observar la PCR de la fusión del gen TMPRSS2-ERG (Figura 27) y la de la β 2-microglobulina (Figura 28)



Figura 27: Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa (2%) de la PCR para determinar la fusión TMPRSS2-ERG en las muestras en estudio. M: marcador de tamaño molecular 100 bp; 1, 3 y 4: casos negativos; 2 y 5: casos positivos; 6: control negativo (caso negativo para la fusión); 7: control positivo; 8: control negativo (no incluye ADNc en la reacción de amplificación).

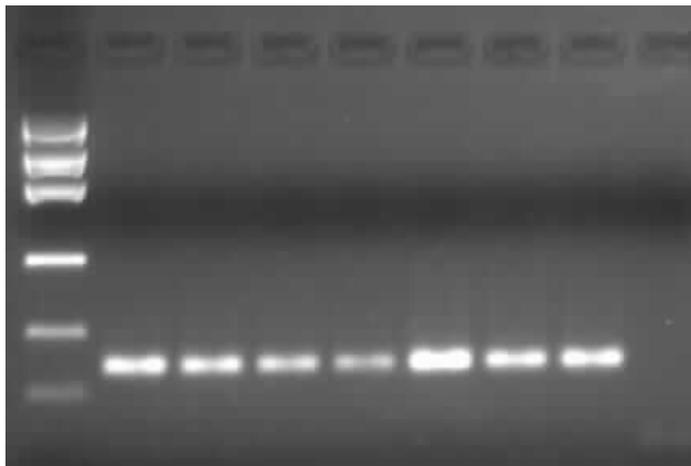


Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR de β 2-microglobulina del cDNA procedente de las muestras en estudio, confirmando que son muestras aptas para el estudio.

Secuenciación

Paralelamente se secuenciaron varias de las muestras con el objetivo de comprobar que la banda amplificada correspondía a la fusión estudiada. En todas las muestras, que fueron positivas para la fusión en la PCR, se detectó la fusión TMPRSS2-ERG por secuenciación (Figura 29).

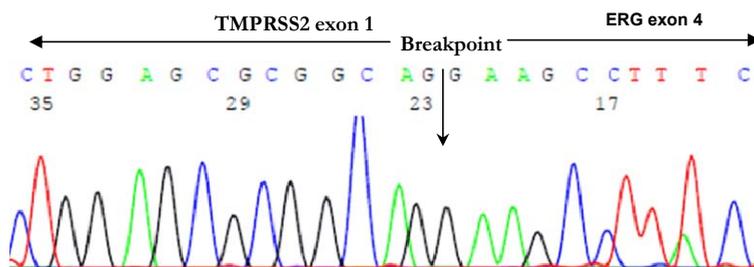


Figura 29: Electroferograma donde se muestra la detección de la fusión quimérica TMPRSS2-ERG mediante análisis de RT-PCR.

1.4 Metilación del gen *PITX2*

Se han estudiado dentro del amplicón seleccionado, 7 regiones ricas en CpG. Los datos relativos a las CpG5 no se pudieron analizar pues según los resultados obtenidos con el EpiTyper no se detectó metilación de CpGs. Finalmente, solo aquellas muestras que contenían datos de metilación de todas las CpG fueron consideradas en el análisis. Consecuentemente, 177 pacientes fueron incluidos para el estudio estadístico.

De forma general, podemos decir que los resultados ofrecidos por el estudio de metilación del ADN del EpiTyper del amplicón seleccionado indica que esta región se caracteriza por una baja metilación de ADN, y confirma la hipometilación general de CpGs en la cohorte estudiada.

2. ANÁLISIS UNIVARIANTE

2.1 Marcadores inmunohistoquímicos y variables clínico-patológicas.

A continuación se contrastan los marcadores inmunohistoquímicos (ERG, P504S, PSMA, PSA, p53, β -catenina, RA, Topoisomerasa-II α , FAP, E-cadherina), con las variables clínicas (PSA, estadio clínico, Grupos de riesgo, estadio patológico, Gleason pieza, invasión perineural, márgenes positivos en pieza, ganglios positivos y recidiva bioquímica) con el objetivo de indentificar si alguno de estos marcadores se relaciona con algunas de estas variables.

Dado que no cumplen la normalidad se han aplicado pruebas no paramétricas en todos los contrastes bivariantes. La expresión de los diferentes marcadores se han analizado mediante los test X^2 y U de Mann-Whitney para variables categóricas y continuas respectivamente. Las Tablas 18-27 muestran los resultados.

Empezando por el ERG, no encontramos asociación entre la expresión de ERG y los parámetros clínico-patológicos como podemos observar en la Tabla 18.

En el caso de la racemasa (P504S), en el análisis univariante no muestra significación tampoco para ninguna de las variables clínico-patológicas (Tabla 19).

Para la FAP encontramos que existe asociación de la misma con el estadiaje clínico, de forma que en aquellos tumores donde más se expresa la FAP son aquellos de mejor pronóstico. También en el caso de la IPN encontramos diferencias significativas; aquellos que sobreexpresan la FAP tienen mayor proporción de IPN (23% en casos de FAP positiva respecto al 4% del grupo de FAP negativa). Estos datos podemos observarlos en la Tabla 20.

En el análisis de la expresión de PSA encontramos únicamente asociación con los grupos de riesgo, obteniendo en el bajo riesgo un mayor porcentaje de pérdida de expresión de PSA y en el riesgo intermedio un mayor porcentaje de pacientes que expresan PSA (Tabla 21).

En la Tabla 22 podemos observar los resultados relativos a la PSMA, en la cual no encontramos asociación entre su expresión y las variables clínico-patológicas.

En el caso del RA vemos que muestra una tendencia a expresarse en todos los pacientes. Además, establece una relación significativa con el Gleason de forma que en aquellos casos de pérdida de expresión del RA hay mayor porcentaje de Gleason >7 (Tabla 23).

El marcador p53 muestra una relación significativa en la variable edad, de forma que el grupo de pacientes que sobreexpresan esta proteína son de mayor edad (aproximadamente 3 años de media por encima). Además, observamos que aquellos pacientes que sobreexpresan la p53 se asocian a variables de peor pronóstico, como mayor estadiaje (mayor porcentaje de T3) mayor Gleason en la pieza, mayor porcentaje de IPN y de RBq). Estos datos se presentan en la Tabla 24.

Ya por último, comentar que no encontramos asociación entre la expresión de Topoisomerasa-II α y ninguna de las variables clínico-patológicas. Tampoco en el caso de la E-cadherina ni β -catenina como se muestra en las Tablas 25-27.

Tabla 18: Relación entre la expresión de ERG y las variables clínico-patológicas.
(test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	ERG		p
	Negativo (n = 125) % (n)	Positivo (n = 70) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,67 (5,13)	64,05 (5,76)	0,429*
PSA			
<10	72,8 (91)	72,9 (51)	0,917
10-20	24 (30)	22,9 (16)	
>20	3,2 (4)	4,3 (3)	
Estadaje clínico			
T1	74,4 (93)	62,9 (44)	0,091
T2	25,6 (32)	37,1 (26)	
Grupos de riesgo			
Bajo	45,6 (57)	45,7 (32)	0,998
Intermedio	43,2 (54)	42,9 (30)	
Alto	11,2 (14)	11,4 (8)	
Estadaje pieza			
T2	80 (100)	74,3 (52)	0,356
T3	20 (25)	25,7 (18)	
Gleason pieza			
<7	27,2 (34)	28,6 (20)	0,954
7	49,6 (62)	50 (35)	
>7	23,2 (29)	21,4 (15)	
Invasión perineural			
No	80 (100)	75,7 (53)	0,485
Sí	20 (25)	24,3 (17)	
Márgenes positivos			
No	57,6	(72) 61,4 (43)	0,602
Sí	42,4 (53)	38,6 (27)	
Ganglios positivos			
No	95,2 (119)	95,7 (67)	0,870
Sí	4,8 (6)	4,3 (3)	
Recidiva bioquímica			
No	60,8 (76)	64,3 (45)	0,630
Sí	39,2 (49)	35,7 (25)	

* Test de la U de Mann-Whitney.

Tabla 19: Relación entre la expresión de P504S y las variables clínico-patológicas.
(test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	P504S		p
	Negativo (n = 110) % (n)	Positivo (n = 84) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,27 (5,22)	64,74 (5,66)	0,554*
PSA			
<10	71,8 (79)	73,8 (62)	0,830
10-20	24,5 (27)	21,4 (18)	
>20	3,6 (4)	4,8 (4)	
Estadaje clínico			
T1	68,2 (75)	72,6 (61)	0,577
T2	30,9 (34)	27,4 (23)	
T3	0,9 (1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	43,6 (48)	48,8 (41)	0,206
Intermedio	40,9 (45)	44 (37)	
Alto	15,5 (17)	7,1 (6)	
Estadaje pieza			
T2	73,6 (81)	83,3 (70)	0,107
T3	26,4 (29)	16,7 (14)	
Gleason pieza			
<7	24,8 (27)	32,1 (27)	0,214
7	48,6 (53)	51,2 (43)	
>7	26,6 (29)	16,7 (14)	
Invasión perineural			
No	78,2 (86)	79,8 (67)	0,789
Sí	21,8 (24)	20,2 (17)	
Márgenes positivos			
No	54,5 (60)	64,3 (54)	0,172
Sí	45,5 (50)	35,7 (30)	
Ganglios positivos			
No	94,5 (104)	96,4 (81)	0,537
Sí	5,5 (6)	3,6 (3)	
Recidiva bioquímica			
No	57,3 (63)	66,7 (56)	0,183
Sí	42,7 (47)	33,3 (28)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 20: Relación entre la expresión de FAP y las variables clínico-patológicas. (test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	FAP		p
	Negativo (n = 23) % (n)	Positivo (n = 177) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,39 (4,0)	64,38 (5,59)	0,995*
PSA			
<10	65,2 (15)	74,6 (132)	0,062
10-20	21,7 (5)	22,6 (40)	
>20	13 (3)	2,8 (5)	
Estadaje clínico			
T1	52,2 (12)	72,3 (128)	0,005
T2	43,5 (10)	27,7 (49)	
T3	4,3 (1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	43,5 (10)	46,9 (83)	0,077
Intermedio	30,4 (7)	42,9 (76)	
Alto	26,1 (6)	10,2 (18)	
Estadaje pieza			
T2	86,4 (19)	77,4 (137)	0,335
T3	13,6 (3)	22,6 (40)	
Gleason pieza			
<7	42,9 (9)	27,1 (48)	0,189
7	47,6 (10)	49,2 (87)	
>7	9,5 (2)	23,7 (42)	
Invasión perineural			
No	95,7 (22)	76,8 (136)	0,037
Sí	4,3 (1)	23,2 (41)	
Márgenes positivos			
No	69,6 (16)	58,2 (103)	0,296
Sí	30,4 (7)	41,8 (81)	
Ganglios positivos			
No	91,3 (21)	96 (170)	0,302
Sí	8,7 (2)	4 (7)	
Recidiva bioquímica			
No	56,5 (13)	63,3 (112)	0,529
Sí	43,5 (10)	36,7 (65)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 21: Relación entre la expresión de PSA y las variables clínico-patológicas (test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	PSA		p
	Negativo (n = 52) % (n)	Positivo (n = 147) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,50 (5,22)	64,37 (5,57)	0,929*
PSA			
<10	75 (39)	72,1 (106)	0,595
10-20	19,2 (10)	24,5 (36)	
>20	5,8 (3)	3,4 (5)	
Estadaje clínico			
T1	76,9 (40)	68 (100)	0,091
T2	21,2 (11)	32 (47)	
T3	1,9(1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	61,5 (32)	40,8 (60)	0,024
Intermedio	26,9 (14)	47,6 (70)	
Alto	11,5 (6)	11,6 (17)	
Estadaje pieza			
T2	75 (39)	79,6 (117)	0,489
T3	25 (13)	20,4 (30)	
Gleason pieza			
<7	29,4 (15)	27,9 (41)	0,364
7	54,9 (28)	46,9 (69)	
>7	15,7 (8)	25,2 (37)	
Invasión perineural			
No	75 (39)	79,6 (117)	0,489
Sí	25 (13)	20,4 (30)	
Márgenes positivos			
No	57,7 (30)	60,5 (89)	0,718
Sí	42,3 (22)	39,5 (58)	
Ganglios positivos			
No	92,3 (48)	96,6 (142)	0,201
Sí	7,7 (4)	3,4 (5)	
Recidiva bioquímica			
No	65,4 (34)	61,2 (90)	0,595
Sí	34,6 (18)	38,8 (71)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 22: Relación entre la expresión de PSMA y las variables clínico-patológicas.
(test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	PSMA		p
	Negativo (n = 54) % (n)	Positivo (n = 142) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,72 (5,88)	64,34 (5,31)	0,661*
PSA			
<10	75,9 (41)	71,8 (102)	0,602
10-20	22,2 (12)	23,2 (33)	
>20	1,9 (1)	4,9 (7)	
Estadaje clínico			
T1	70,4 (38)	70,4 (100)	0,824
T2	29,6 (16)	28,9 (41)	
T3	0	0,7 (1)	
Grupos de riesgo			
Bajo	51,9 (28)	44,4 (63)	0,431
Intermedio	40,7 (22)	42,3 (60)	
Alto	7,4 (4)	13,4 (19)	
Estadaje pieza			
T2	81,5 (44)	76,8 (109)	0,476
T3	18,5 (10)	23,3 (33)	
Gleason pieza			
<7	37 (20)	24,8 (35)	0,235
7	42,6 (23)	51,8 (73)	
>7	20,4 (11)	23,4 (33)	
Invasión perineural			
No	83,3 (45)	76,8 (109)	0,316
Sí	16,7 (9)	23,2 (33)	
Márgenes positivos			
No	66,7 (36)	56,3 (80)	0,189
Sí	33,3 (18)	43,7 (62)	
Ganglios positivos			
No	98,1 (53)	94,4 (134)	0,258
Sí	1,9 (1)	5,6 (8)	
Recidiva bioquímica			
No	63 (34)	61,3 (87)	0,827
Sí	37 (20)	38,7 (55)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 23: Relación entre la expresión de RA y las variables clínico-patológicas.
(test de X² excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	RA		p
	Negativo (n = 111) % (n)	Positivo (n = 85) % (n)	
Edad (Media ± DE)	63,21 (4,70)	64,50 (5,57)	0,250*
PSA			
< 10	69,4 (77)	76,5 (65)	0,158
10-20	27,9 (31)	17,6 (15)	
> 20	2,7 (3)	5,9 (5)	
Estadaje clínico			
T1	70,3 (78)	69,4 (59)	0,519
T2	29,7 (33)	29,4 (25)	
T3	0	1,2 (1)	
Grupos de riesgo			
Bajo	42,3 (47)	50,6 (43)	0,473
Intermedio	45,9 (51)	37,6 (32)	
Alto	11,7 (13)	11,8 (10)	
Estadaje pieza			
T2	76,6 (85)	80 (68)	0,566
T3	23,4 (26)	20 (17)	
Gleason pieza			
<7	28,8 (32)	27,4 (23)	0,030
7	42,3 (47)	58,3 (49)	
>7	28,8 (32)	14,3 (12)	
Invasión perineural			
No	77,5 (86)	81,2 (69)	0,528
Sí	22,5 (25)	18,8 (16)	
Márgenes positivos			
No	53,2 (59)	67,1 (57)	0,05
Sí	46,8 (52)	32,9 (28)	
Ganglios positivos			
No	93,7 (104)	97,6 (83)	0,190
Sí	6,3 (7)	2,4 (2)	
Recidiva bioquímica			
No	62,2 (69)	60 (51)	0,758
Sí	37,8 (42)	40 (34)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 24: Relación entre la expresión de p53 y las variables clínico-patológicas.
(test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	P53		p
	Negativo (n = 173) % (n)	Positivo (n = 29) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	63,85 (5,35)	66,83 (5,42)	0,003*
PSA			
<10	75,7 (131)	58,6 (17)	0,109
10-20	20,2 (35)	37,9 (11)	
>20	4 (7)	3,4 (1)	
Estadaje clínico			
T1	70,5 (122)	65,5 (19)	0,772
T2	28,9 (50)	34,5 (10)	
T3	0,6 (1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	48,6 (84)	31 (9)	0,208
Intermedio	39,9 (69)	51,7 (15)	
Alto	11,6 (20)	17,2 (5)	
Estadaje pieza			
T2	81,5 (141)	62,1 (18)	0,018
T3	18,5 (32)	37,9 (11)	
Gleason pieza			
<7	31,4 (54)	3,4 (1)	0,002
7	49,4 (85)	55,2 (16)	
>7	19,2 (33)	41,4 (12)	
Invasión perineural			
No	81,5 (141)	62,1 (18)	0,018
Sí	18,5 (32)	37,9 (11)	
Márgenes positivos			
No	60,7 (105)	51,7 (15)	0,363
Sí	39,3 (68)	48,3 (14)	
Ganglios positivos			
No	96,5 (167)	89,7 (26)	0,097
Sí	3,5 (6)	10,3 (3)	
Recidiva bioquímica			
No	65,3 (113)	44,8 (13)	0,035
Sí	34,7 (60)	55,2 (16)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 25: Relación entre la expresión de Topoisomerasa-II α y las variables clínico-patológicas.(test de χ^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	Topoisomerasa-II α		p
	Negativo (n = 99) % (n)	Positivo (n = 95) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,22 (5,34)	64,26 (5,65)	0,959*
PSA			
< 10	76,8 (76)	69,5 (66)	0,487
10-20	19,2 (19)	26,3 (25)	
> 20	4 (4)	4,2 (4)	
Estadaje clínico			
T1	72,7 (72)	68,4 (65)	0,458
T2	26,3 (26)	31,6 (30)	
T3	1 (1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	46,5 (46)	44,2 (42)	0,618
Intermedio	43,4 (43)	41,1 (39)	
Alto	10,1 (10)	14,7 (14)	
Estadaje pieza			
T2	80,8 (80)	74,7 (71)	0,309
T3	19,2 (19)	25,3 (24)	
Gleason pieza			
< 7	28,6 (28)	26,3 (25)	0,925
7	49 (48)	51,6 (49)	
> 7	22,4 (22)	22,1 (21)	
Invasión perineural			
No	78,8 (78)	78,9 (75)	0,978
Sí	21,2 (21)	21,1 (20)	
Márgenes positivos			
No	64,6 (64)	52,6 (50)	0,089
Sí	35,4(35)	47,4 (45)	
Ganglios positivos			
No	97 (96)	93,7 (89)	0,277
Sí	3 (3)	6,3 (6)	
Recidiva bioquímica			
No	63,3 (63)	58,9 (56)	0,503
Sí	36,4 (36)	41,1 (75)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Tabla 26: Relación entre la expresión de E-cadherina y las variables clínico-patológicas (test de X^2 excepto para la edad).

Variable clínico-patológica	E-cadherina		p
	Negativo (n = 17) % (n)	Positivo (n = 183) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	66,12 (3,57)	64,33 (5,54)	0,075 *
PSA			
<10	70,6 (12)	73,2 (134)	0,580
10-20	29,4 (5)	22,4 (41)	
>20	0	4,4 (8)	
Estadaje clínico			
T1	64,7 (11)	69,9 (128)	0,849
T2	35,3 (6)	29,5 (54)	
T3	0	0,5 (1)	
Grupos de riesgo			
Bajo	41,2 (7)	47,5 (87)	
Intermedio	41,2 (7)	41 (75)	0,731
Alto	17,6 (3)	11,5 (21)	
Estadaje pieza			
T2	75 (12)	78,7 (144)	0,731
T3	25 (4)	21,3 (39)	
Gleason pieza			
<7	37,5 (6)	28,6 (52)	0,750
7	43,8 (7)	48,9 (89)	
>7	18,8 (3)	22,5 (41)	
Invasión perineural			
No	76,5 (13)	79,8 (146)	0,746
Sí	23,5 (4)	20,2 (37)	
Márgenes positivos			
No	70,6 (12)	58,5 (107)	0,330
Sí	29,4 (5)	41,5 (76)	
Ganglios positivos			
No	94,1 (16)	95,6 (175)	0,774
Sí	5,9 (1)	4,4 (8)	
Recidiva bioquímica			
No	76,5 (13)	61,2 (112)	0,214
Sí	23,5 (4)	38,8 (71)	

* Test de U de Mann-Whitney

Tabla 27: Relación entre la expresión de β -catenina y las variables clínico-patológicas.(test de X^2 excepto para la edad)

Variable clínico-patológica	β -catenina		p
	Negativo (n = 76) % (n)	Positivo (n = 118) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,39 (4,82)	64,28 (5,87)	0,887*
PSA			
<10	67,1 (51)	76,3 (90)	0,364
10-20	28,9 (22)	20,3 (24)	
>20	3,9 (3)	3,4 (4)	
Estadaje clínico			
T1	64,5 (49)	73,7 (87)	0,211
T2	34,2 (26)	26,3 (31)	
T3	1,3 (1)	0	
Grupos de riesgo			
Bajo	46,1 (35)	45,8 (54)	0,621
Intermedio	39,5 (30)	44,1 (52)	
Alto	14,5 (11)	10,2 (12)	
Estadaje pieza			
T2	77,6 (59)	78,8 (93)	0,845
T3	22,4 (17)	21,2 (25)	
Gleason pieza			
<7	29,3 (22)	28 (33)	0,498
7	44 (33)	51,7 (61)	
>7	26,7 (20)	20,3 (24)	
Invasión perineural			
No	82,9 (63)	76,3 (90)	0,270
Sí	17,1 (13)	23,7 (28)	
Márgenes positivos			
No	55,3 (42)	61,9 (73)	0,361
Sí	44,7 (34)	38,1 (45)	
Ganglios positivos			
No	97,4 (74)	94,9 (112)	0,402
Sí	2,6 (2)	5,1 (8)	
Recidiva bioquímica			
No	65,8 (50)	59,3 (70)	0,365
Sí	34,2 (26)	40,7 (48)	

* Test de U de Mann-Whitney.

Se realiza un subanálisis de aquellos pacientes que han llevado tratamiento hormonal, pues se trata de pacientes que se diferencian de los que hemos considerado como RBq ya que si llevan este tipo de tratamiento es porque el PSA ha progresado tras la RT o bien porque han presentado ascensos de PSA importantes. Tampoco podemos incluirlos en el grupo de recaídas clínicas pues en éstos deben existir pruebas de imagen que confirmen las lesiones.

Tras estudiar los marcadores inmunohistoquímicos según el grupo de pacientes que ha llevado HT respecto al que no la ha llevado, observamos que el PSMA se expresa en mayor cuantía (85 frente a 15%) en los pacientes con tratamiento hormonal ($p=0,046$)

2.2 Análisis de TMPRSS2-ERG y variables clínico-patológicas.

En las muestras del estudio se analizó la relación entre la presencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG (obtenido mediante qPCR) y las variables clínico-patológicas citadas en la Tabla 28. Sólo la presencia de los márgenes positivos difiere significativamente según la presencia o no de la fusión génica ($p=0,021$). Observamos que en el grupo en el que se da la fusión hay un menor porcentaje de márgenes negativos.

Tabla 28: Relación entre la expresión del gen de fusión y las variables clínico-patológicas (test de X^2 excepto para la edad).

Variable clínico-patológica	Gen de fusión TMPRSS2-ERG		p*
	Negativo (n = 95) % (n)	Positivo (n = 119) % (n)	
PSA			
<10	65,3 (62)	77,3 (92)	
10-20	30,5 (29)	18,5 (22)	
>20	4,2 (4)	4,2 (5)	0,118
Estadaje clínico			
T1	67,4 (64)	69,7 (83)	
T2	32,6 (31)	29,4 (35)	0,601
T3	0	0,8 (1)	
Gleason pieza			
<7	26,9 (25)	29,9 (35)	
7	53,8 (50)	45,3 (53)	0,448
>7	19,4 (18)	24,8 (29)	
Grupos de riesgo			
Bajo	43,2 (41)	47,9 (57)	
Intermedio	47,4 (45)	37,8 (45)	0,299
Alto	9,5 (9)	14,3 (17)	
Estadaje patológico			
T2	75,5 (71)	81,4 (96)	0,303
T3	24,5 (23)	18,6 (22)	
IPN			
No	80 (76)	79,8 (95)	0,976
Sí	20 (19)	20,2 (24)	
Margen			
No	52,6 (50)	68,1 (81)	0,021
Sí	47,4 (45)	31,9 (38)	
Ganglios			
No	95,8 (91)	95,8 (114)	0,997
Sí	4,2 (4)	4,2 (5)	
Recidiva bioquímica			
No	61,1 (58)	64,7 (77)	0,582
Sí	38,9 (37)	35,3 (42)	

*Test de U de Mann-Whitney

2.3 Metilación de *PITX2* y variables clínico-patológicas

En el estudio de la metilación se realiza un análisis aglomerativo jerarquizado de *clusters* en nuestra serie. El objetivo principal del *clustering* es identificar grupos diferentes representativos de los datos de la metilación mediante la inspección visual de los resultados. Así, de una manera intuitiva, podemos ver si determinadas características clínicas, son representativas de alguno de los grupos de muestras obtenidos. Para ello generamos un *heatmap* que muestran los resultados del análisis de metilación e incluyen información según el Gleason, la IPN, los márgenes quirúrgicos y la RBq. (Figuras 30-33)

No identificamos una clara asociación entre las variables evaluadas en los *clusters*.

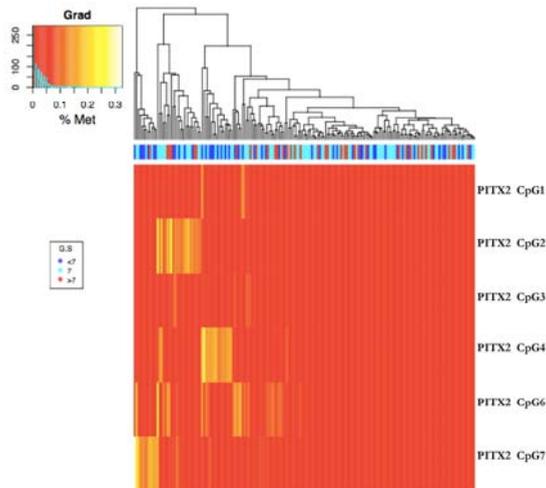


Figura 30: Mapa de zonas calientes en las CpGs según el Gleason

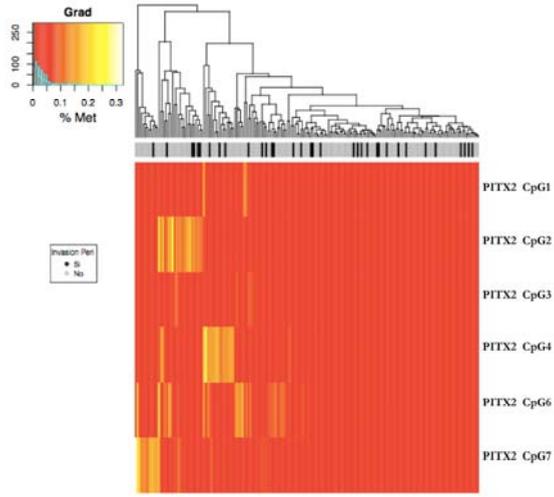


Figura 31: Mapa de zonas calientes en las CpGs según la IPN

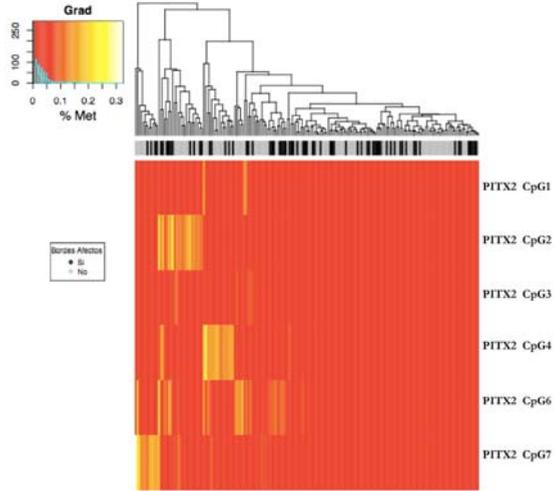


Figura 32: Mapa de zonas calientes en las CpGs según MQP

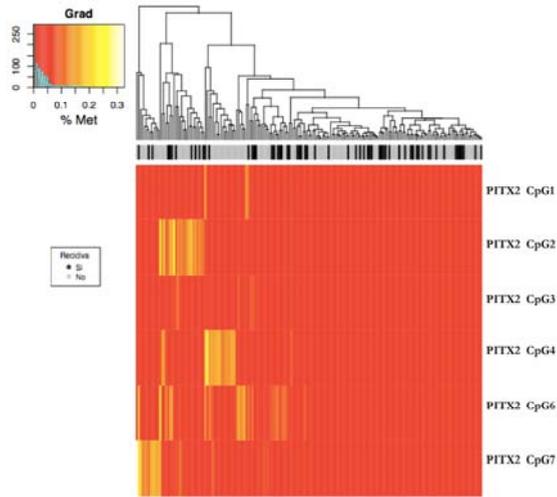


Figura 33: Mapa de zonas calientes en las CpGs según la RBq

A continuación, realizamos los contrastes entre el grupo de hipometilados frente a hipermetilados para las variables clínico-patológicas analizándose cada uno de los segmentos ricos en CpGs estudiadas de forma categorizada. Hay que tener en cuenta que en este caso la hipermetilación es relativa pues partimos de medias bajas.

Podemos observar en la Tabla 29 que únicamente la hipermetilación del segmento CpG1 presenta asociación con alguna variable clínico-patológica, en concreto con la RBq, de forma que aquellos pacientes hipermetilados tienen mayor tasa de recaídas (Figura 34).

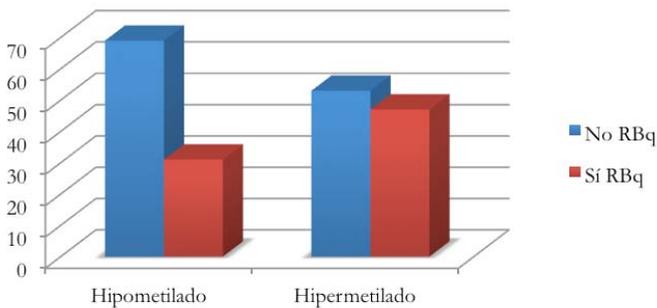


Figura 34: Relación significativa entre metilación CpG1 y RBq. $p=0,028$.

Tabla 29 : Relación de variables clínico-patológicas con metilación CpG1 del gen PITX2. (test de X^2 excepto para la edad).

Variable clínico-patológica	Metilación CpG1		p
	Hipometilado (n = 133) % (n)	Hipermetilado (n = 64) % (n)	
Edad (Media \pm DE)	64,85(\pm 4,94)	64,31 (\pm 5,94)	0,642*
PSA			
< 10	71,4 (95)	67,2 (43)	
10-20	24,8 (33)	26,6 (17)	
> 20	3,8 (5)	6,3 (4)	0,687
Estadíaie clínico			
T1	67,7 (90)	70,3 (45)	
T2	32,3 (43)	28,1 (18)	0,306
T3	0	1,6 (1)	
Gleason pieza			
< 7	29 (38)	24,2 (15)	0,772
7	47,3 (62)	51,6 (32)	
> 7	23,7 (31)	24,2 (15)	
Grupos de riesgo			
Bajo	46,6 (62)	39,1 (25)	0,403
Intermedio	39,8 (53)	50 (32)	
Alto	11,5 (18)	10,9 (7)	
Estadíaie pieza			
T2	77,9 (102)	78,1 (50)	0,967
T3	22,1 (29)	21,9 (14)	
Invasión perineural			
No	80,5 (107)	78,1 (50)	0,704
Sí	19,5 (26)	21,9 (14)	
Márgenes positivos			
No	62,4 (83)	57,8 (37)	0,536
Sí	37,6 (50)	42,2 (27)	
Ganglios positivos			
No	95,5 (127)	96,9 (62)	0,644
Sí	4,5 (6)	3,1 (2)	
Recidiva bioquímica			
No	69,2 (92)	53,1 (34)	0,028
Sí	30,8 (41)	46,9 (30)	

* Test de U de Mann-Whitney

No observamos, sin embargo, ningún tipo de asociación entre el grado de metilación del resto de segmentos del amplicón (CpG2, CpG3, CpG4, CpG6 y CpG7) con las variables clínico-patológicas.

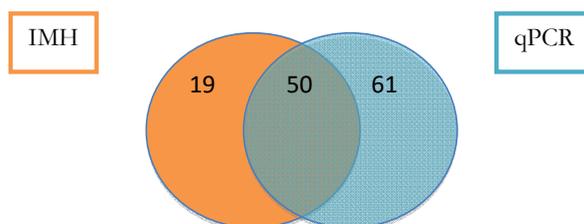
2.4 Correlación entre marcadores inmunohistoquímicos y *TMPRSS2-ERG*.

Con el objetivo de encontrar correlación entre la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos contrastamos ambos marcadores. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Observamos que existe una correlación entre la positividad de ERG en la inmunohistoquímica y la presencia del gen de fusión existiendo concordancia de casos positivos cercana al 50%.

En nuestro estudio considerando como prueba patrón la qPCR, obtenemos una sensibilidad y especificidad relativamente bajas (Figura 35), del 45 y 77% respectivamente, y un valor predictivo positivo (VPP) de 66% y valor predictivo negativo (VPN) de 58%.

A) ERG+ y *TMPRSS2-ERG* +



B) ERG- y *TMPRSS2-ERG* -

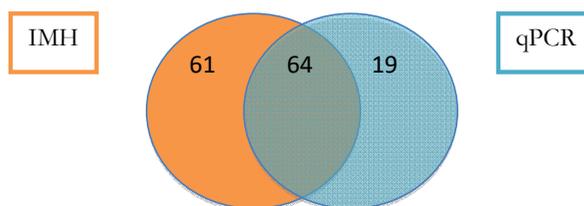


Figura 35: Diagrama de Venn mostrando la clasificación de los pacientes de acuerdo con los resultados de la IMH y la qPCR.

Tabla 30: Relación entre marcadores inmunohistoquímicos y gen de fusión (*test de X²).

Variable clínico-patológica	Gen de fusión TMPRSS2-ERG		p*
	Negativo (n = 83) % (n)	Positivo (n = 111) % (n)	
ERG			
	No	77,1 (64)	0,001
	Sí	29,9 (19)	
P504S			
	No	59 (49)	0,619
	Sí	41 (34)	
PSMA			
	No	24,1 (20)	0,334
	Sí	75,9 (63)	
PSA			
	No	13,1 (11)	0,395
	Sí	86,9 (73)	
FAP			
	No	11,9 (10)	0,896
	Sí	88,1 (74)	
RA			
	No	64,6 (53)	0,064
	Sí	35,4 (29)	
P53			
	No	90,7 (78)	0,074
	Sí	9,3 (8)	
Topoisomerasa-II α			
	No	52,4 (43)	0,785
	Sí	47,6 (39)	
β -catenina			
	No	43,9 (36)	0,269
	Sí	56,1 (46)	
E-cadherina			
	No	10,7 (9)	0,349
	Sí	89,3 (75)	

2.5 Correlación entre metilación de *PITX2* y gen de fusión *TMPRSS2-ERG*

Al contrastar el estatus del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* respecto a la metilación, observamos que no existe asociación significativa para ninguna de las CpGs estudiadas (Tabla 31).

Tabla 31: Relación entre metilación de *PITX2* y gen de fusión. (*test de X^2).

Variable clínico-patológica	Gen de fusión <i>TMPRSS2-ERG</i>		p*
	Negativo (n = 86) % (n)	Positivo (n = 111) % (n)	
CpG1			
Hipometilado	68,6 (59)	66,7 (74)	0,773
Hipermetilado	31,4 (27)	33,3 (37)	
CpG2			
Hipometilado	52,4 (43)	52,3 (57)	0,984
Hipermetilado	47,6 (39)	47,7 (52)	
CpG3			
Hipometilado	54,8 (46)	52,3 (58)	0,728
Hipermetilado	45,2 (38)	47,7 (53)	
CpG4			
Hipometilado	56,5 (48)	56,5 (61)	0,999
Hipermetilado	43,5 (37)	43,5 (47)	
CpG6			
Hipometilado	56,6 (47)	59,5 (66)	0,692
Hipermetilado	43,4 (36)	40,5 (45)	
CpG7			
Hipometilado	53,5 (46)	56,1 (64)	0,709
Hipermetilado	46,5 (40)	43,9 (50)	

2.6 Relación entre *ERG* y metilación de *PITX2*

Al contrastar las diferentes CpGs según el grado de metilación con la expresión de *ERG*, observamos que el caso de la CpG7 existe una asociación con la expresión de *ERG*, de forma que dentro del grupo de hipermetilados hay una mayor expresión de *ERG* ($p=0,048$) (Tabla 32).

Tabla 32: Relación entre marcadores expresión de ERG y metilación del gen PITX2 (*test de X^2).

CpG7	Negativo ($n = 117$)	Positivo ($n = 63$)	p^*
	% (n)	% (n)	
Hipometilado	59,8 (70)	44,4 (28)	0,048
Hipermetilado	40,2 (47)	55,6 (35)	

3. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

En este apartado realizaremos un análisis univariante de supervivencia usando el test Log-rank de todos los parámetros que se han analizado a lo largo del estudio. Para mejor comprensión se ha dividido en los siguientes apartados:

- Parámetros clínico-patológicos
- Marcadores inmunohistoquímicos
- Gen de fusión Tmprss2-ERG
- Metilación del gen PITX2

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

Tanto para el análisis univariante como para el multivariante se tomará como punto final la recaída bioquímica.

3.1 Análisis univariante de supervivencia.

El análisis univariante previo a la relación del modelo incluyó aquellas variables clínicas con repercusión en la progresión de la enfermedad como son el PSA, los grupos de riesgo, el Gleason de la pieza, el estadio patológico, los márgenes positivos o la IPN.

Variables clínico-patológicas

En la Figura 36 podemos observar las curvas de supervivencia relacionadas con las

variables clínicas en las cuales se han obtenido diferencias estadísticamente significativas para el tiempo hasta la RBq entre los grupos analizados.

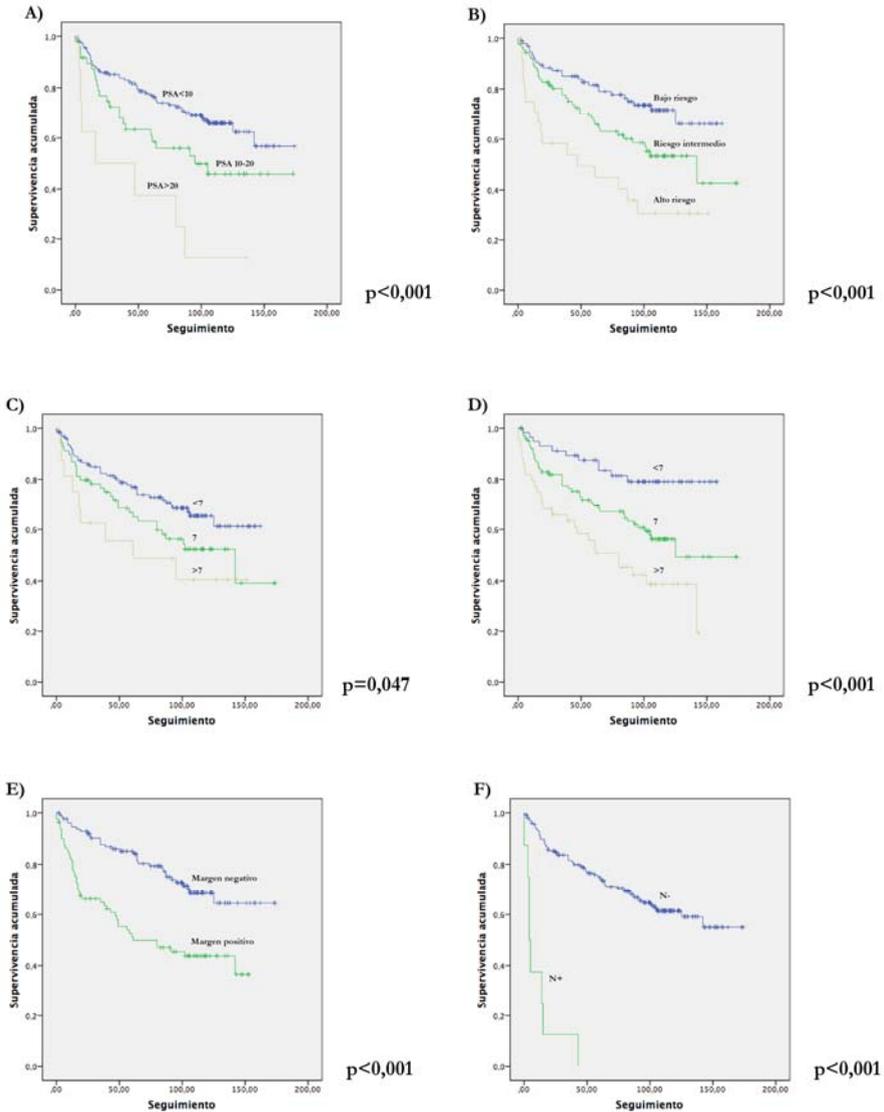
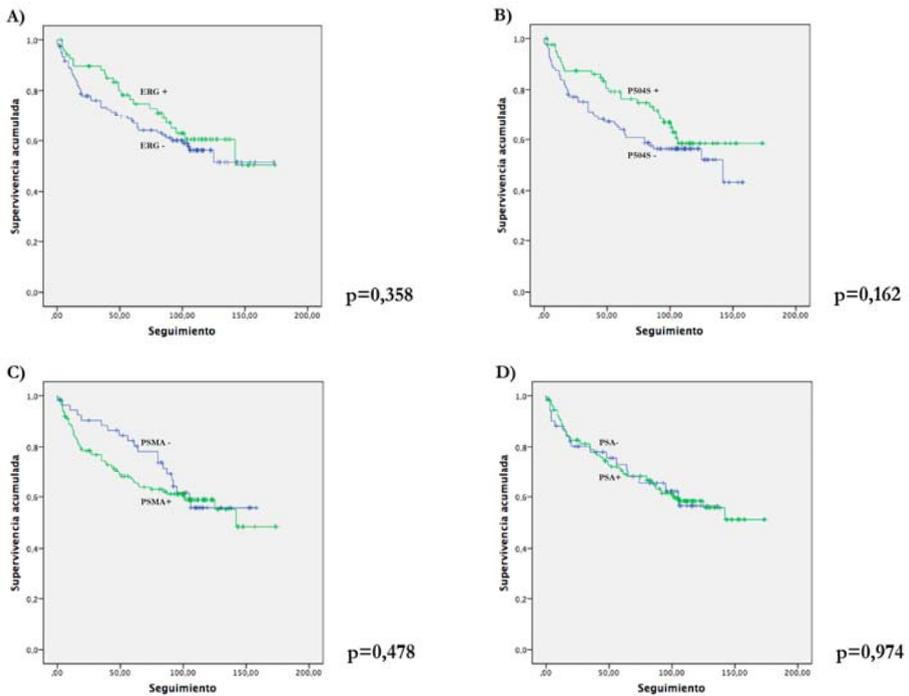


Figura 36: Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante de las variables clínico-patológicas respecto al tiempo hasta la RBq. A) PSA preoperatorio B) Grupos de riesgo C) Score de Gleason de la biopsia D) Score de Gleason de la pieza E) Márgenes de la pieza afectados F) Ganglios afectados.

Como podemos observar en las curvas de supervivencia, la probabilidad de que exista una recidiva bioquímica es mayor en aquellos pacientes con PSA elevado, en el grupo de pacientes alto riesgo e intermedio los Gleason elevados, los márgenes quirúrgicos afectados y los ganglios positivos.

Marcadores inmunohistoquímicos

En el caso de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos sólo la expresión de p53 muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para el tiempo libre de RBq como se muestra en la Figura 37. Las curvas de Kaplan-Meier del resto de biomarcadores indican que no existen diferencias entre los grupos de pacientes.



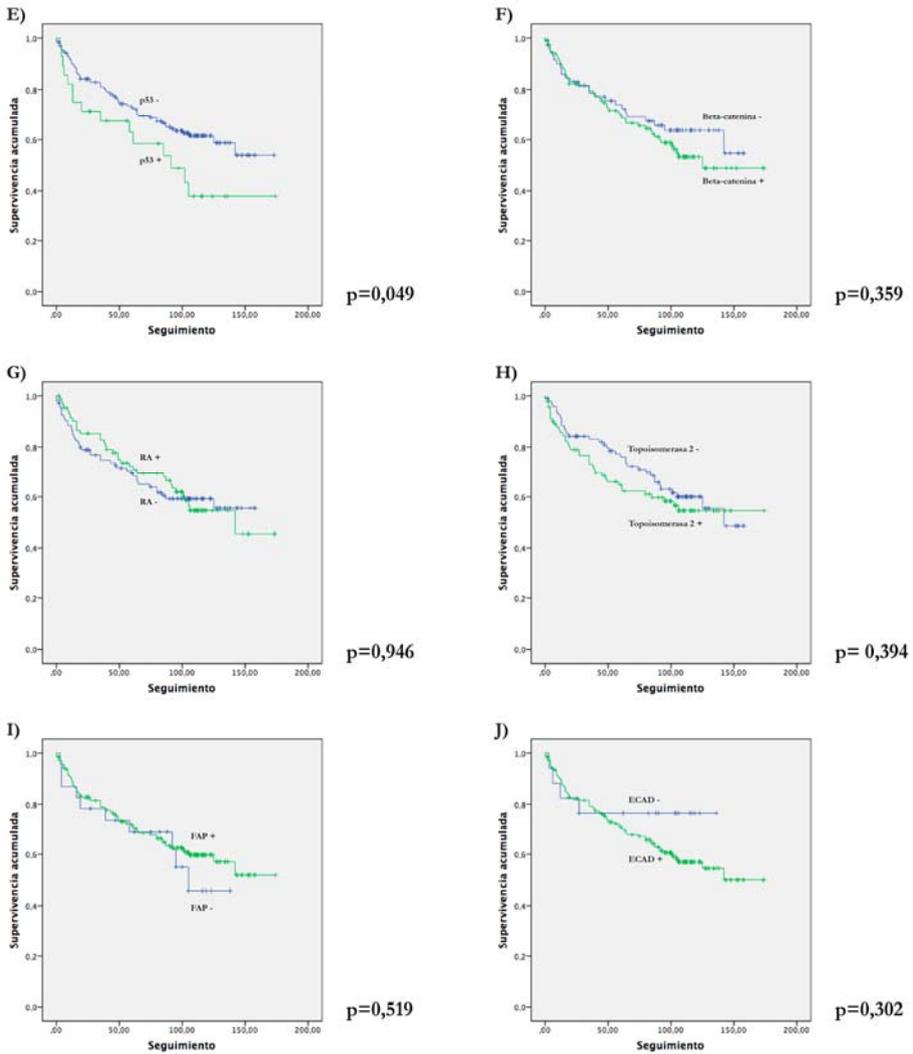


Figura 37: Curvas de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante de los marcadores inmunohistoquímicos respecto al tiempo hasta la RBq. Se presentan las variables: A) ERG, B) P504S, C) PSMA, D) PSA, E) p53, F) β-catenina, G) RA, H) Topoisomerasa-IIα, G) FAP, H) E- cadherina.

Considerando que la utilidad de estos marcadores puede ser diferente dependiendo del grupo de riesgo D'Amico, clasificación utilizada en la práctica clínica, consideramos el realizar de nuevo el análisis de estos marcadores estratificando según esta variable. Observamos que es para los pacientes de bajo riesgo donde la expresión de p53 tiene mayor utilidad para diferenciar aquellos pacientes que van a tener peor pronóstico ($p=0,031$). Lo podemos ver gráficamente en la Figura 38.

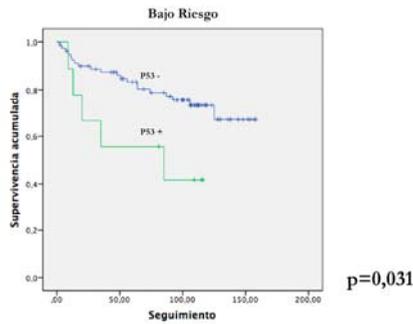


Figura 38: Curva Kaplan-Meier correspondiente a análisis univariante de supervivencia de la expresión de p53 en los pacientes de bajo riesgo en relación al tiempo hasta la RBq.

Del mismo modo, cuando estratificamos según el Gleason, observamos que el grupo de pacientes con Gleason > 7 que expresan la proteína p53 van a tener un peor pronóstico que aquellos que no la expresan ($p=0,026$) como observamos en la Figura 39.

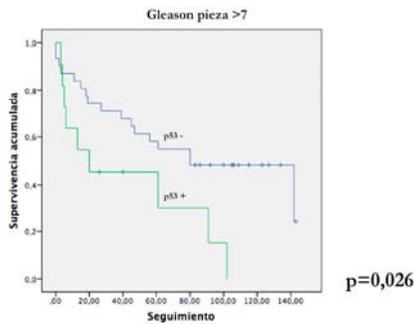


Figura 39: Curva Kaplan-Meier correspondiente a análisis univariante de supervivencia de la expresión de p53 en los pacientes con Gleason >7 en relación al tiempo hasta la RBq

Gen de fusión TMRSS2-ERG

Al comparar las curvas del análisis de supervivencia de ambos grupos de pacientes, el grupo con positividad para el gen versus el negativo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la progresión de la enfermedad (Figura 40).

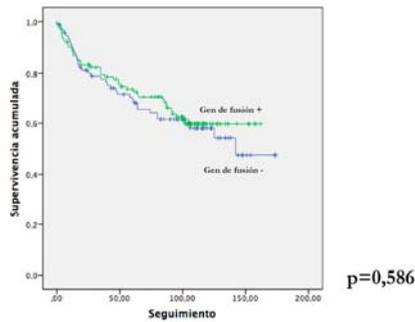


Figura 40: Curva de Kaplan-Meier correspondiente al análisis de supervivencia univariante del gen de fusión TMRSS2-ERG respecto al tiempo hasta la RBq

Metilación

En cuanto a la metilación del gen PITX2, como era de esperar, sólo la hipermetilación del segmento CpG1 muestra relación con la supervivencia libre de RBq (Figura 41).

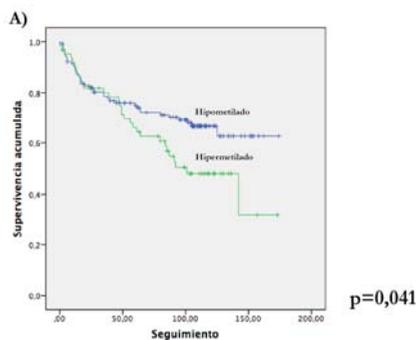


Figura 41: Curva de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante del grado de metilación del gen PITX2 (CpG1) respecto al tiempo hasta la RBq.

Cuando estratificamos según el Gleason observamos que la hipermetilación del segmento CpG1 del gen PITX2 muestra claramente un peor pronóstico en aquellos casos de Gleason más bajos. Figura 42.

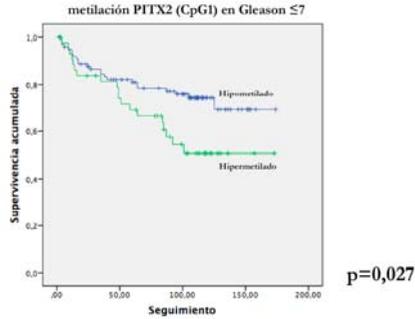


Figura 42: Curva de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante del grado de metilación del gen PITX2 (CpG1) respecto al tiempo hasta la RBq en los Gleason ≤ 7.

Cuando estratificamos este análisis según los grupos de riesgo obtenemos que estas diferencias en cuanto a la RBq en el caso de CpG1 es para el grupo bajo riesgo (Figura 43).

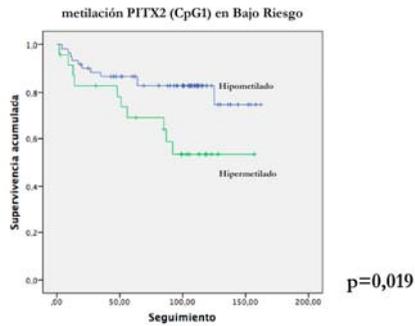


Figura 43: Curva de Kaplan-Meier correspondientes al análisis de supervivencia univariante del grado de metilación respecto al tiempo hasta la RBq estratificado por grupos de riesgo.

3.2 Análisis multivariante de supervivencia.

En la Tabla 33 se muestran los resultados del análisis multivariante realizados mediante una regresión de Cox donde hemos incluido aquellos parámetros que hemos obtenido significativos en el análisis univariante.

Tabla 33: Resultados del análisis multivariante de supervivencia libre RBq por regresión de Cox.

Variable	R. R.	IC 95 % (mín.-máx.)	<i>p</i>
Grupo de riesgo	3,353	(1,696–6,627)	0,001
pT	3,986	(2,331–6,816)	<0,001
Ganglios	7,412	(2,834–19,385)	<0,001
CpG1	1,664	(1,012–2,735)	0,045

El análisis de regresión muestra que además de las variables clínicas grupos de riesgo, estadio patológico y presencia de ganglios positivos, la hipermetilación de la CpG1 del gen PITX2 también es un factor predictor de RBq. Ello implica que el riesgo de progresión para los pacientes que presenten el gen PITX2 hipermetilado tendrán cerca del doble de riesgo de recidiva bioquímica respecto a los que presentan hipometilación.

DISCUSIÓN

El progresivo envejecimiento de la población y los avances en sus métodos diagnósticos han convertido al CaP en una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad, siendo la segunda causa de mortalidad por cáncer en el varón²⁸⁵.

Esta enfermedad presenta un curso evolutivo incierto, y los parámetros clínico-patológicos habituales han demostrado ser insuficientes para predecir dicha evolución, por lo que se hace necesario el estudio de nuevos marcadores pronósticos complementarios, que nos permitan diferenciar los tumores indolentes de aquellos que van a progresar.

El objetivo principal de este estudio es establecer estas herramientas que nos ayuden a configurar perfiles pronósticos del paciente con CaP, por medio del estudio de la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos, la presencia o ausencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG y el grado de metilación del gen PITX2. Pretendemos estudiar su relación con la progresión de la enfermedad y averiguar si la presencia de estos marcadores tiene utilidad pronóstica.

1. NUESTRA SERIE

Previo a la valoración de los resultados referentes a los nuevos marcadores pronósticos que se evalúan en este estudio, pasamos a detallar aquellas variables clínicas cuyos resultados difieren respecto de las series de referencia, pues en determinadas ocasiones esto puede justificar ciertos resultados que no concuerdan con la literatura.

En este sentido, llama la atención las diferencias existentes entre el Gleason de la biopsia y el de la pieza de PR, así como la diferencia entre el estadiaje clínico y patológico.

En el caso del Gleason, observamos que la frecuencia de Gleason <7 , de 7 y > 7 en la biopsia es de 59, 33 y 8% respectivamente, mientras que en el caso de la pieza es del 28, 50 y 22%. Es importante este aspecto, pues el grado de Gleason hoy en día es uno de los factores determinantes a la hora de decidir la pauta a seguir en los pacientes con CaP.

Múltiples autores han publicado trabajos sobre este fenómeno de infragradación en la biopsia, estableciéndose una concordancia entre el Gleason de la misma y el de la prostatectomía en torno al 50% en las diferentes series²⁸⁶⁻²⁸⁷.

Esta infragradaación puede ser debida a diferentes factores, entre ellos, la variabilidad interobservador existente, pues no deja de ser una valoración en parte subjetiva. Las recomendaciones para reducir al máximo los problemas derivados de esta variabilidad incluyen el aumento de la objetividad de los criterios de Gleason y la existencia de un uropatólogo especializado²⁸⁸. De hecho, con el objetivo de mejorar los criterios utilizados para definir el Gleason, se realizó una revisión del sistema de puntuación en la reunión de Consenso sobre Gleason de la ISUP del 2005⁴⁹. En nuestro centro todas las muestras han sido analizadas por la misma uropatóloga de forma que al menos, existe cierta homogeneidad en el análisis.

También el número de cilindros influye en el grado de concordancia entre muestras, como se detalla en el estudio publicado en 2006 por Mian y cols. donde se presenta el esquema de la biopsia como único factor capaz de mejorar la correlación entre el Gleason de la biopsia y de la pieza, siendo ésta mejor a mayor número de cilindros²⁸⁹. En nuestra serie los pacientes incluidos pertenecen a los años previos a ampliar el esquema de biopsia de nuestro centro, por lo que tan solo se obtenía un total de 6 cilindros. Este hecho podría explicar el porcentaje elevado de infragradaación de la biopsia en nuestro estudio.

En el caso del estadiaje, el valor más llamativo en nuestra serie es el del T3, teniendo en el estadiaje clínico un 1% y un 21% en el patológico. En el momento del estudio, la estadiación local estaba limitada por la deficiencia de técnicas de imagen correctas para el estadiaje local preoperatorio. Con el objetivo de mejorarlo se utilizan hoy en día nuevas técnicas, como es el caso de las diferentes modalidades de la RM. La resonancia magnética multiparamétrica (RMM), es considerada la modalidad más útil para el estadiaje local del CaP. Sin embargo, ofrece una baja sensibilidad para la detección de extensión extraprostática, y tiene escasa utilidad en el bajo riesgo²⁰⁻²⁹¹. Con el fin de mejorar la precisión en el estadiaje local también se emplea la RM endorrectal (RM-e), la cual aporta una mayor exactitud, consiguiendo una mejor caracterización espacial de la anatomía zonal prostática²⁵. Aumenta la calidad de la imagen y mejora la localización en comparación con la RM tradicional, por lo que aporta un valor adicional en la estadiación local del CaP²⁶. Tiene utilidad principalmente en la identificación preoperatoria de extensión extracapsular y la invasión de las vesículas seminales cuando es interpretada por radiólogos genitourinarios especializados²⁷.

No hemos encontrado que ninguno de nuestros marcadores se relacionen con la presencia de IPN. De hecho, la significación pronóstica de esta variable sigue en entredicho. Para muchos autores la presencia de IPN en la biopsia es un indicador de riesgo de extensión

extraprostática (EEP), de afectación de márgenes y de RBq²⁹²⁻²⁹⁴. En diferentes estudios se ha postulado una relación de la IPN con otros factores pronósticos conocidos como son el Gleason, el estadio clínico o los MQP en la pieza. En cuanto al establecimiento de factor predictor independiente de recidiva tumoral los estudios son dispares, no siendo hoy en día un factor concluyente de recidiva²⁹⁵.

Por otra parte, la tasa de márgenes positivos obtenidos en el análisis es de aproximadamente un 40%. En las series publicadas las tasas que se presentan son muy variables, pero en todo caso, menores a los presentados en nuestro estudio, con valores en un rango que va del 10 al 33%²⁹⁶⁻²⁹⁸.

Con la llegada de las técnicas mínimamente invasivas, como la prostatectomía radical laparoscópica (PRL) y robótica (PRRB) se postuló que la tasa de márgenes afectos aumentaría. No sólo por la curva de aprendizaje, sino también por el auge de las cirugías preservadoras de bandeletas neurovasculares²⁹⁹. Sin embargo, parece ser que la incidencia de MQP va disminuyendo progresivamente, por una parte por el diagnóstico más temprano con estadios más iniciales y por otra parte por una mayor experiencia quirúrgica en las diferentes vías de abordaje de la PR. De hecho, en un meta-análisis del 2012, en el cual se comparaban los resultados oncológicos tras PRR, PRL y PRRB, no encontraron diferencias en cuanto a la tasa de MQP³⁰⁰.

En nuestra serie, en el período de tiempo del 1999 al 2005 todavía no se habían implantado técnicas mínimamente invasivas en nuestro centro, pero sí que era el inicio de la PR abierta. La incorporación de nuevos cirujanos del servicio a la realización de esta técnica, los residentes en formación junto con la infragradación y el infraestadiaje, podrían explicar la alta tasa de márgenes que hemos obtenido en el trabajo.

El valor de los márgenes positivos nos lleva a comentar la RBq, pues es sabido que existe correlación entre ambas variables²⁹⁸, de forma que la tasa de márgenes positivos podría justificar la elevada cifra de RBq de la serie presentada (36%).

De los pacientes incluidos en el estudio, tan solo 9 presentaban ganglios positivos. La explicación a este hecho es sencilla, y es por dos motivos: el primero porque en el periodo de tiempo del que son los pacientes no se intervenían aquellos que eran diagnosticados de un CaP de alto riesgo. Con la publicación de los trabajos de Bolla en el 1997 sobre el tratamiento combinado con RT y HT para los tumores localmente avanzados, los pacientes eran derivados a estas opciones terapéuticas y la cirugía era reservada para tumores clínicamente

localizados³⁰¹. Esto justifica nuestro escaso número de altos riesgo en la serie, por lo tanto, menores pacientes N positivos.

Por otra parte, anteriormente las linfadenectomías no eran ampliadas, sólo se realizaban las linfadenectomías ileobturatrices, nivel mucho más limitado que el que se recomienda en la actualidad. Cabe destacar que en estudios recientes se ha demostrado que la fosa obturatriz no siempre es la ubicación primaria de depósitos metastásicos en los ganglios linfáticos, por lo que una linfadenectomía pélvica limitada a la fosa obturatriz pasaría por alto alrededor del 50 % de las metástasis ganglionares. Por lo tanto, a la hora de realizar una linfadenectomía pélvica, debe considerarse una linfadenectomía ampliada, a pesar de tener el inconveniente de requerir mayor experiencia quirúrgica y mayor tiempo intraoperatorio³⁰². Hoy en día el método de referencia para la estadificación N sigue siendo la linfadenectomía quirúrgica pero la ampliada, pues las técnicas de imagen tienen baja rentabilidad para detección de adenopatías. Puede realizarse mediante técnica abierta, laparoscópica o robótica.

2. EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

A lo largo del tiempo se han buscado marcadores capaces de ayudar en la clasificación, diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CaP. Constantemente surgen nuevos trabajos sobre diferentes biomarcadores, como consecuencia de la relativa necesidad de encontrar métodos de clasificación de riesgo diferentes y más precisos que de los que disponemos en la actualidad³⁰³. Aún así, todavía no disponemos de ninguno que haya conseguido sustituir a las actuales herramientas utilizadas en la práctica habitual. Además, no hay que pasar por alto, que los métodos utilizados, entre ellos el Gleason, no dejan de ser técnicas parcialmente subjetivas.

También los marcadores inmunohistoquímicos, tal y como se interpretan hoy en día, son técnicas sujetas a la valoración personal del patólogo. Tradicionalmente, las tinciones inmunohistoquímicas se han puntuado de forma manual, sin embargo, es un trabajo que requiere un tiempo elevado e implica una importante subjetividad. Con el fin de mejorarla, aparecen métodos de puntuación, tanto de la intensidad de la tinción como de la extensión de la misma, que permiten una mayor imparcialidad. Estos sistemas de puntuación son conocidos como métodos semicuantitativos³⁰⁴. Aún así no evitan éstos cierta variabilidad, pues no deja de ser una medida personal. Esto implica que pueda haber heterogeneidad en la metodología entre los diferentes trabajos, pues además, no existen criterios claros para definir a partir de cuándo consideramos un marcador positivo o negativo, o a partir de qué valor

consideramos la expresión de una proteína normal o anómala. No hay una definición como tal que pueda unificar criterios.

Con el fin de intentar hacer la medición de estos marcadores más objetiva, se han creado métodos automáticos de cuantificación. Han surgido diferentes dispositivos como el AQUA, Ariol SL-50 (Genetix, San José, California, USA) o el *Nuance system from CRi* (Woburn, Massachusetts, USA), que mediante un escáner y un software de análisis de imagen son capaces de leer los TMA's con las inmunohistoquimias de forma automatizada³⁰⁵. Estos sistemas de puntuación cuantitativos han demostrado tener buena correlación con los métodos semicuantitativos, por lo que serían unos buenos sustitutos de la valoración del patólogo³⁰⁶.

En nuestro trabajo, con el fin de aumentar la objetividad, el método semicuantitativo ha sido realizado por dos uropatólogos diferentes, ninguno de ellos conocedores de los casos, y se ha hecho una media entre la interpretación dada por cada uno de ellos. Aún así, como hemos comentado previamente, es difícil comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros grupos, pues la metodología utilizada varía mucho de un estudio a otro y en algunos casos no se especifica con exactitud los criterios empleados.

Centrándonos en nuestro estudio, pasamos a comentar los resultados obtenidos en los marcadores inmunohistoquímicos.

El PSA es un antígeno específico de la próstata que pertenece a la familia de las kaliceínas, y tiene actividad quimotripsina. Se sintetiza tanto en el epitelio prostático normal como el tumoral y su expresión está directamente regulada por el RA³⁰⁷⁻³⁰⁹. Un análisis detallado del mecanismo de la actividad del promotor del PSA ha mostrado que el control de la transcripción del gen de PSA no se limita únicamente a la regulación androgénica, sino que puede verse inducido además por otros factores, como por ejemplo la p53³¹⁰.

La utilidad de la expresión de PSA es fundamentalmente diagnóstica, para confirmar focos de adenocarcinoma en los que existen dudas respecto al tumor primario, para confirmar que es de origen prostático. La cuestión a valorar es si además de un complemento para el diagnóstico en situaciones especiales puede ser un buen marcador pronóstico. Es conocido que la expresión de PSA se pierde a medida que aumenta el grado de Gleason en los tumores prostáticos³¹¹⁻³¹³, sin embargo, pocos son los estudios que han buscado demostrar la validez como marcador pronóstico. Entre ellos, encontramos el trabajo de Erbersdobler y cols. del 2009, donde de forma específica buscan el valor predictivo de la expresión de PSA en las piezas de PR para la RBq. Observan que el patrón de Gleason 3 es el principal responsable de

la expresión de PSA, motivo que justificaría que tengamos una expresión elevada en los Gleason 7, pues la mayor parte de ellos son 3+4, de forma que tienen un comportamiento similar al 3+3. Concluyen que la pérdida de expresión de PSA se asocia con diferentes características patológicas adversas, como son un Gleason desfavorable, estadios más avanzados y localización periférica del tumor, pero en el estudio multivariante no se muestra como factor independiente predictor de RBq, datos comparables a nuestros resultados³¹⁴.

Previamente, otros trabajos fueron publicados buscando el potencial pronóstico del PSA en la inmunohistoquímica, no obteniendo asociación alguna con el Gleason o estadio, y coincidiendo en que la expresión de PSA no era un factor predictor de recidiva en el CaP³¹⁵.

En nuestro trabajo hemos encontrado asociación entre este marcador y los grupos de riesgo, y no con el resto de variables clínico-patológicas, así como tampoco se ha postulado como marcador pronóstico.

Con todo ello podemos decir que el PSA es un marcador que parece tener una correlación inversa con el grado diferenciación tumoral en el CaP, sin que pueda considerarse como un factor predictor de RBq, por lo tanto quedando relegado a su uso como marcador diagnóstico.

La FAP es una de las proteínas mayormente secretadas por el epitelio prostático normal, así como en el tejido prostático tumoral, por lo tanto, con un importante valor diagnóstico. A pesar de los intentos en buscar la utilidad de la FAP como biomarcador pronóstico del CaP, no se ha podido llegar a resultados concluyentes.

Diferentes líneas de estudio sugieren que la FAP es un supresor tumoral específico del CaP. El mecanismo mediante el cual puede mediar la regulación es por su acción tirosin-fosfatasa. De esta manera, se ha observado que el nivel de tirosin-fosforilación, la actividad específica tirosin-quinasa y la tasa de crecimiento celular, se correlacionan inversamente con la actividad de la FAP en las células tumorales prostáticas. La expresión y actividad de la FAP en las células tumorales prostáticas es menor que en el tejido normal o hiperplásico de la próstata. Así, la pérdida de expresión de FAP en las muestras con CaP se correlaciona con la tumorigénesis y el CaP hormono-resistente³¹⁶⁻³¹⁷.

Hay un estudio que evalúa la expresión de la FAP tras PR y concluye que el grado de tinción de esta proteína es un predictor de la supervivencia. Además, aquellos pacientes que progresan y que presentan mayor tinción a FAP son mejor respondedores al tratamiento hormonal³¹⁸.

Por otra parte, la FAP participa en otros aspectos del CaP, como son las metástasis óseas. Ya en el 1936 Gutman y cols.³¹⁹ describieron un aumento de la actividad fosfatasa en los sitios de metástasis óseas osteoblásticas, indicando que la producción de la FAP juega un papel importante en el comportamiento osteoblástico de estas lesiones. Existen estudios al respecto más actuales que han demostrado que la FAP promueve la mineralización ósea en las metástasis por CaP³²⁰⁻³²¹.

En nuestra serie la expresión de FAP, a pesar de ser elevada en la valoración global, se encuentra fundamentalmente expresada en aquellos tumores de mejor pronóstico, en concreto, en los que están clasificados como T1. Estos resultados concuerdan con los diferentes trabajos que describen una expresión elevada en el tejido normal³²² y una pérdida de la expresión en la evolución de la enfermedad prostática, por su papel como supresor tumoral en la carcinogénesis prostática^{105,323-324}.

Un dato a explicar de los que obtenemos con este marcador es el mayor porcentaje de IPN en los pacientes que expresan FAP, resultado que no concuerda con la hipótesis hasta ahora comentada de que la expresión reducida se relaciona con un peor pronóstico. Ante estos resultados no encontramos un sentido biológico que lo justifique. Además, no hay en la literatura trabajos que aporten evidencia respecto a la expresión de FAP según la presencia o ausencia de IPN, por lo que es difícil comparar resultados en este sentido.

Diversos estudios han puesto de manifiesto el hecho de que el RA se encuentra presente en el CaP, tanto primario como metastásico, independientemente del grado de diferenciación o del estadio tumoral³²⁵.

La expresión del RA en el CaP se ha descrito en porcentajes en torno al 50% , lo cual corresponde a los hallazgos encontrados en nuestro estudio, donde la positividad de expresión del RA es del 44%. Sin embargo, no se ha llegado a establecer de forma consistente su relación con la supervivencia en el CaP. Varios estudios han puesto de manifiesto que la positividad del RA en las muestras de PR no tiene significación pronóstica³²⁶.

En el presente trabajo hemos encontrado que existe una relación entre la positividad para el RA y el Gleason, de forma que aquellos tumores más indiferenciados tienen una menor expresión de RA. No encontramos, por otra parte, relación entre la sobreexpresión del RA y la progresión de la enfermedad. Un estudio que apoya estas ideas es el de Henshall y cols. en el cual no observan ninguna relación entre la expresión de esta proteína con los parámetros clínico-patológicos convencionales³²⁷.

Por otra parte, la sobreexpresión del RA ha sido relacionada con la aparición de hormono-resistencia en el transcurso evolutivo de la enfermedad³²⁸. Se observa que el hecho de que el CaP progrese a hormono-resistente implica una modificación de la expresión del RA, la cual aumenta, pues sabemos que los andrógenos y más su receptor, están implicados en la evolución del CaP³²⁹. Se han postulado varios mecanismos por los que la expresión del RA podría contribuir a este hecho, como por ejemplo la amplificación del gen del receptor (este gen rara vez aparece amplificado en el CaP primario, pero sí lo hace en el 30% de los tumores hormono-resistentes)³³⁰. También la existencia de frecuentes mutaciones del RA, observadas en tumores en los que la terapia hormonal ha fracasado³³¹ y la activación del RA producida por citoquinas y diferentes factores de crecimiento. Sin embargo son éstos mecanismos más complejos que escapan del objetivo de nuestro estudio, en el cual no evaluamos pacientes con CPRC, sino tumores con un diagnóstico de CaP localizados.

La proteína p53, se trata de una molécula supresora de tumores, que ejerce su función uniéndose al ADN y regulando la expresión de diferentes genes. Ante determinadas situaciones oncogénicas, responde produciendo la detención del ciclo celular o apoptosis. Las mutaciones en p53 que bloquean su función, implicarán por tanto el desarrollo tumoral.

En el caso del CaP, se ha observado una correlación entre la expresión de p53 y la progresión tras PR, independientemente del Gleason y del estadio³³²⁻³³⁵. La mayoría de estudios establecen un escaso porcentaje de alteraciones de p53 en los estadios tempranos, de forma que las alteraciones de p53 aumentan conforme progresa el CaP. El grupo de Moul JW encontró que tanto p53 como bcl-2 son predictores de recurrencia del CaP tras PR. Estos resultados son obtenidos en piezas de prostatectomía, sin embargo, no pueden llegar a conclusiones similares en muestras de biopsia prostática³³⁶.

En nuestro trabajo hemos encontrado asociación entre este marcador y variables pronósticas convencionales como son el estadio y Gleason patológicos, así como la IPN y la RBq. En el caso del Gleason, observamos que la p53 aparece expresada en mayor proporción en el caso de pacientes con Gleason de 7 o superior. Lo mismo ocurre con el estadiaje, donde observamos que el porcentaje de T3 es mayor en el grupo de pacientes que expresan p53 que en el que no lo hace. La IPN, variable hipotéticamente relacionada con mal pronóstico, también es mayor en el grupo de pacientes que expresan p53. Por último, la tasa de RBq, de forma significativa, es más frecuente en el grupo de pacientes con p53 positiva. Con todo ello, podemos decir que nuestros resultados, en relación con la p53, siguen la línea de los trabajos publicados al respecto.

A modo de curiosidad hemos obtenido un resultado significativo también para la edad, de forma que el grupo de pacientes de mayor edad expresan mayor p53.

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación de la racemasa (P504S), PSMA, topoisomerasa-II α , E-cadherina ni β -catenina con ninguna de las variables clínico-patológicas; tampoco han mostrado ser buenos marcadores pronósticos.

En lo referente a la racemasa, estudios realizados sobre factores pronósticos en el CaP no han evidenciado correlación entre inmunoreactividad para AMACR y grado histológico de Gleason, estadio patológico, estado del margen quirúrgico o índice de proliferación celular. Tampoco se ha demostrado relación de la tinción y las concentraciones séricas de PSA preoperatorios¹¹⁵⁻¹¹⁶. Así pues, nuestros resultados concuerdan con los datos publicados, de forma que la racemasa queda desplazada al plano diagnóstico y no pronóstico.

La PSMA es una proteína que se halla de forma integral en la membrana de las células prostáticas, y se ha observado que puede tener utilidad a la hora de predecir la evolución de los pacientes con CaP. Estudios *in vitro* han mostrado que la expresión de PSMA se incrementa en el CaP respecto a la expresión normal (en torno a un 55%), y es mayor en el caso de las metástasis que alcanza el 100%, de forma que se cree que juega un papel importante en el proceso de progresión de la enfermedad³³⁷. En la misma línea aparecen otros trabajos en los que se evalúa la expresión de PSMA en el epitelio prostático benigno, tumoral y en las metástasis ganglionares, donde se observa que la expresión en todos los casos es elevada, pero aumenta en aquellos casos en los que existen células neoplásicas³³⁸. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en este estudio, pues a pesar de no encontrar una correlación entre PSMA y las diferentes variables, ni mostrarse como un marcador pronóstico, lo expresan cerca de 3/4 partes de los casos con CaP.

Cuando evaluamos aquellos pacientes que van a precisar tratamiento hormonal por progresión de enfermedad (por lo tanto con posibilidad de ser metastáticos), observamos que éstos son mayoritariamente PSMA positivos (el 85%), datos concordantes con la literatura antes comentada.

La topoisomerasa-II α , una enzima implicada en la replicación del ADN, transcripción, recombinación y remodelación de la cromatina, se ha visto involucrada en gran variedad de

tumores³³⁹. En el caso del CaP, la expresión aumentada de Topoisomerasa-II α se ha asociado con la recurrencia y metástasis. Estas células que expresan esta proteína en exceso, presentan una mayor proliferación celular, con mayor potencial cancerígeno³⁴⁰. De esta manera, la topoisomerasa se correlaciona con estadios más avanzados, recurrencia tumoral, metástasis y menor supervivencia en el caso del CaP, concluyendo este trabajo que puede ser un buen marcador pronóstico, a pesar de que en nuestro caso no hayamos obtenido una significación al respecto.

Diferentes estudios muestran una pérdida en la expresión de E-cadherina a medida que aumenta el grado de Gleason y en tumores más indiferenciados³⁴¹⁻³⁴². La E-cadherina es una molécula de adhesión celular, de forma que cuando hay una pérdida de la misma, hay mayor facilidad para la migración celular, y con ello, de progresión tumoral. Sin embargo, se ha puesto en duda su utilidad como marcador pronóstico en los escasos trabajos que hay al respecto³⁴³⁻³⁴⁴.

La β -catenina, la cual juega un papel fundamental en la señalización molecular a nivel nuclear, se ha visto implicada también en la carcinogénesis prostática por medio de la modulación de la actividad del RA. La expresión de dicho marcador en el CaP localizado es significativamente menor en los tejidos tumorales que en el benigno prostático. Además, niveles bajos de β -catenina nuclear pueden predecir un tiempo hasta la RBq más corto. Realizando el análisis en el subgrupo de pacientes con bajo riesgo, podemos decir que los niveles bajos de β -catenina se asocian a un peor pronóstico, es por ello que la determinación de la expresión de este biomarcador puede ser útil especialmente en los pacientes de bajo riesgo. Tampoco nuestros resultados aportan significación estadística, por lo que no podemos extraer las mismas conclusiones³⁴⁵.

Mención especial merece la oncoproteína ERG, pues en nuestro estudio pretendemos evaluar si su positividad se correlaciona con la de la qPCR, y valorar si es un buen marcador pronóstico del CaP.

Se ha observado que muchos factores de transcripción de la familia ETS, entre ellos el ERG, juegan un papel importante en el desarrollo del CaP como consecuencia de un reordenamiento genético. La sobreexpresión de ERG, resultante de la fusión de los genes TMRSS2 y ERG, representa el subtipo más frecuente encontrado en el CaP localizado¹³⁴⁻¹³⁵.

En el estudio de Suryavanski y cols., el 51% de pacientes presentaban expresión de ERG positiva, datos que se corresponden con nuestros resultados, también cercanos a la mitad de los pacientes con ERG positivo. Muestran además que la positividad de ERG se relaciona de forma inversa con la expresión de p53. También observan una fuerte correlación entre la expresión de ERG y del RA (Coeficiente de correlación de Spearman 0,677)³⁴⁶. No es éste un hallazgo aislado, pues otro estudio que viene a apoyar esta idea es el de Hoogland, donde también observan una correlación positiva entre ERG y la expresión tisular del RA ($p < 0,001$)³⁴⁷. En nuestro trabajo encontramos ciertas similitudes, pues también observamos que una mayor expresión de ERG se asocia a la expresión del RA, pero también con la racemasa y la p53, en la cual a diferencia de lo que presentan en este estudio, encontramos una correlación positiva. Otro estudio que viene a apoyar este resultado en relación a la p53, es el de Nishijima y cols, en el cual encuentran que los pacientes que presentan el reordenamiento de ERG se asocian a una p53 elevada en pacientes con CaP³⁴⁸. Así pues la fusión se asocia a la expresión elevada de p53 ($p = 0,005$) lo que sugiere que las mutaciones de esta proteína pueden conducir a unos reordenamientos más agresivos del gen de fusión en el CaP.

Además hay otros biomarcadores del estroma prostático que también se han asociado al ERG. Son marcadores que implican una mayor agresividad tumoral, como es el caso del hialuronan, PDGFR β y la Caveolina-1³⁴⁹.

Estos resultados son consistentes con la complejidad que implica la carcinogénesis del CaP, dónde son múltiples las vías que participan y los productos implicados, de ahí la dificultad en llegar a obtener marcadores únicos.

Al hilo de lo comentado, la expresión de ERG puede verse afectada en aquellos casos en los que el tumor es menos diferenciado, de ahí que en casos de CaP más avanzados, en los que hay una pérdida de expresión del RA, haya también una pérdida de ERG, a pesar de existir el reordenamiento genético. En estos casos, la detección del marcador debe realizarse por medio de otras técnicas, como por ejemplo FISH. En nuestros resultados no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grado de expresión de la proteína dependiendo del estadiaje o del Gleason, pero sí que aparece expresado en mayor proporción en el Gleason menor o igual a 7 que en el mayor a 7 (78% frente a 22%), y en el estadio T2 que en el T3. (74% frente a 26%).

Como se ha comentado en la introducción, son varios los productos ERG de la fusión génica TMPRSS2-ERG. En un estudio reciente se evalúa el tipo de producto detectado por medio de un sistema conocido como PRISM (high-pressure high-resolution separations with intelligent selection and multiplexing)-SRM(selected reaction monitoring) con el fin de

cuantificar la proteína ERG en las células tumorales prostáticas³⁵⁰. Este método les permite identificar 6 subtipos diferentes de ERG en aquellas células que presentan la fusión génica, no apareciendo en las que no la tienen (indicando que la expresión de ERG está aumentada ante la presencia del gen de fusión)³⁵¹. Finalmente, concluyen que dos subtipos de ERG distintos se pueden expresar simultáneamente en las muestras con TMPRSS2-ERG positivas, de forma que esta metodología puede ser útil para tipificar el subtipo de CaP a nivel molecular, no solo de forma cualitativa, sino también cuantitativa. Estos resultados nos llevan a hipotetizar que los anticuerpos seleccionados para dichas proteínas deben ser específicos y posiblemente los resultados dispares entre series puedan ser debidos al uso de diferentes anticuerpos frente a proteínas ERG diferentes.

Por otra parte, también hemos querido valorar la posible relación existente entre la expresión de ERG y los factores pronósticos, así como la supervivencia en el CaP. Nuestros resultados sugieren que no existe asociación entre parámetros clínicos y ERG, ni con el riesgo de RBq. Sin embargo los resultados presentes en la literatura a este respecto no dejan de ser contradictorios, pues encontramos en diferentes publicaciones conclusiones dispares.

Un estudio que evalúa la positividad de ERG como factor pronóstico concluye que la expresión de ERG se asocia al CaP clínicamente avanzado y con la supervivencia, sin embargo, no ven correlación con el PSA o Gleason. Hay que reseñar que se trata de un estudio con muy pocos pacientes (30 pacientes de los cuales tan solo 9 tenían CaP localizado, 11 localmente avanzado y el resto eran HBP) por lo que sus conclusiones deben tenerse en cuenta con cautela³⁵². En la misma línea presentan los resultados de su estudio el grupo sueco de Hägglöf, así como otro publicado en 2015 por Font-Tello, los cuales también muestran una asociación entre la expresión de ERG y la supervivencia cáncer específica^{349,353}.

Otro estudio interesante es el de Berg y cols., en el que evalúan a pacientes sometidos a VA, a los cuales determinan la expresión de ERG en las biopsias y establecen la correlación con la progresión de la enfermedad. Concluyen que aquellos pacientes ERG-positivos muestran una mayor incidencia de progresión general ($p < 0,0001$), y por subgrupos de progresión de PSA ($p < 0,0001$) y progresión histopatológica ($p < 0,0001$). Además, en el estudio multivariante la expresión de ERG es un factor predictor de progresión (R.R=2.45; IC 95%=1.62-3.72). De esta manera, proponen la determinación de ERG para estimar el riesgo de progresión en pacientes incluidos en protocolos de VA³⁵⁴.

Otros trabajos encuentran resultados similares, en los cuales la proporción de pacientes con expresión de ERG positiva está relacionado con el estadio, de forma que a mayor

positividad del ERG, peor estadio. No encuentran diferencias tampoco para los valores de PSA preoperatorio, gleason ni IPN. Concretan que no obstante, que llegados a estadios muy avanzados se pierde la fuerza de tinción³⁴⁶. En nuestro caso no hemos evaluado de forma diferenciada la positividad celular y la intensidad de la tinción, sino el resultado de la suma de ambas, por lo que a pesar de no encontrar resultados compatibles en cuanto a relación con estadio, tampoco hemos podido evaluar la pérdida de intensidad por separado.

Llegados a este punto parece oportuno comentar los resultados del meta-análisis más importante realizado al respecto, donde se muestran los resultados de la cohorte más larga que examina la sobreexpresión de ERG en pacientes tratados mediante PR³⁵⁵.

En la cohorte prospectiva se incluyen 1.180 pacientes tratados mediante PR con una mediana de seguimiento de 12,6 años. No se encontró asociación significativa entre la sobreexpresión de ERG y la recurrencia bioquímica (R.R=0,99; IC 95%=0,78-1,26). En el meta-análisis se incluyen 5.074 pacientes sometidos a PR, con seguimiento hasta la aparición de recidiva o muerte. Se observa que la fusión del gen TMPRSS2-ERG se asocia al estadio patológico, pero no a la recidiva bioquímica (R.R=1; CI 95%=0,86-1,17) ni a la enfermedad letal (R.R=0,99; CI 95%=0,47-2,09).

Otro estudio más reciente que viene a apoyar estas conclusiones, es el de Hoogland y cols. del 2012, donde observan que la expresión de ERG en la inmunohistoquímica no es un factor predictivo de recurrencia bioquímica, recurrencia local ni supervivencia global tras PR en el CaP, resultados compatibles con los obtenidos en nuestro trabajo³⁴⁷.

Una de las lecturas que podemos extraer de nuestros resultados y apoyados por las series prospectivas de la literatura, es que la inmunopositividad de ERG no puede ser considerada como un factor pronóstico en el CaP³⁵⁶.

3. GEN DE FUSIÓN TMPRSS2-ERG

Desde que Tomlins en el 2005 sacara a la luz los resultados relativos al gen de fusión TMPRSS2-ERG en el CaP¹⁷⁴, son múltiples las publicaciones que han surgido al respecto.

La frecuencia de expresión del gen TMPRSS2-ERG se estima que está en torno al 50% con ciertas variaciones entre las series publicadas. Estas diferencias pueden deberse en parte al método elegido para la determinación del gen de fusión, al tipo de muestra analizada (biopsia prostática, pieza de prostatectomía radical, orina o sangre) y al tipo de pacientes seleccionados

(CaP localizados, localmente avanzados, metastásicos)^{174,201,205,357}.

En nuestro caso, obtenemos una positividad del gen del 56%, valor que se acerca a las tasas publicadas hasta ahora. Con el fin de confirmar la presencia del gen de fusión, cogimos de forma aleatoria 80 casos y realizamos una RT-PCR como segundo método de determinación, la cual era concordante con los de la qPCR. Posteriormente, se hizo la secuenciación de los casos positivos, los cuales mostraban la fusión con esta técnica.

Por esta elevada frecuencia del gen de fusión en el CaP, inicialmente se valoró su papel como prueba diagnóstica. Es sabido que la presencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG tiene un papel causal en la iniciación del CaP, pues sabemos que ya en el HGPIN existe la fusión^{208,358}, además de ser cáncer prostático específico, pues no se expresa en el tejido prostático benigno²³². A pesar de los prometedores resultados en este sentido, en la actualidad, todavía no ha llegado a sustituir al PSA en el diagnóstico precoz. Sí que es utilizada en determinadas situaciones, como complemento del PSA o para llegar al diagnóstico de metástasis con tumor primario desconocido en aquellos centros que disponen de este test. Además, hay que tener en cuenta que se puede determinar en orina por lo que es un test no invasivo^{234,359}.

El FISH es considerado el método de referencia para su determinación, pero también podemos detectarlo mediante PCR y por inmunohistoquímica, estudiando la expresión de la proteína resultante, la ERG truncada. Este método muestra alta sensibilidad y especificidad respecto al gold estándar, que como se ha comentado es el FISH. El grado de concordancia entre el gen de fusión por FISH y la detección de ERG en la inmunohistoquímica es elevada, según muestra la literatura. Es el caso del trabajo realizado por Park y cols. en 2010, los cuales obtienen una sensibilidad para ERG cercana al 100% a la hora de detectar el reordenamiento genético, con solo 2 casos de 131 (1,5%) que expresaban ERG sin ser positivos para la fusión TMPRSS2-ERG. La especificidad era de 95,7%, con lo que pueden concluir que el anticuerpo anti-ERG muestra una exquisita asociación entre el reordenamiento ERG y la expresión del producto la proteína ERG truncada¹³⁷. Resultados similares obtiene otra publicación en la cual muestran buena correlación entre la expresión del ERG en inmunohistoquímica y la positividad del gen mediante qPCR, motivo por el cual proponen este marcador como nueva herramienta diagnóstica³⁶⁰.

No ocurre lo mismo en nuestro estudio, donde los valores relativos a la sensibilidad y especificidad quedan algo más alejados de esta cifras tan optimistas (45 y 77%

respectivamente). Estas diferencias entre ambos tests, nos hace plantearnos si realmente el test inmunohistoquímico de la proteína ERG es tan exacto como se ha reflejado previamente.

El papel del gen de fusión como factor pronóstico ha estado en debate hasta hoy en día, sin que se haya podido llegar a conclusiones satisfactorias, pues los resultados son contradictorios. En la mayoría de estos estudios la presencia del gen se evalúa tras PR y se evalúa la asociación con el desarrollo de RBq, igual que en nuestro caso, donde las muestras son obtenidas tras la prostatectomía radical.

Así pues, el objetivo fundamental de estos trabajos, así como en parte el nuestro, es encontrar al utilidad de esta marcador molecular, pues dado que aparece de forma recurrente en el CaP, su mejor caracterización puede ayudarnos en la práctica clínica. De hecho, muchos estudios han mostrado un perfil tumoral diferente dependiendo de la presencia o ausencia del gen de fusión^{219,361-361}.

Nuestros resultados podemos decir que no muestran una asociación entre la positividad del gen con ninguna de las variables clínico-patológicas relacionadas clásicamente al pronóstico. Obtenemos como significativa una mayor tasa de márgenes positivos en el grupo de fusión negativa, sin embargo estos hallazgos no se asocian a una mayor tasa de afectación ganglionar ni de RBq, por lo que no encontramos que tengan una significación clínica concreta.

En a literatura podemos encontrar resultados que van en nuestra línea, pero también otros que contradicen nuestras conclusiones.

Es el caso del estudios como el de Rajput en el cual encuentran relación entre el gen de fusión y el grado de Gleason. En éste, la determinación del gen, a diferencia de nosotros, se realiza mediante FISH. Obtienen un porcentaje de fusión positiva mayor en los casos de tumores pobremente diferenciados (40,7%) que aquellos bien diferenciados (6,7%), por lo que concluyen que el gen de fusión aporta información pronóstica relevante que permite la subclasificación del CaP²³⁹. De hecho, como concluye en trabajo de Attard, en el cual evalúan el estatus del gen de fusión en pacientes con CPRC, aquellos tumores con la fusión representan un subgrupo de tumores más sensible al bloqueo con abiraterona, por lo tanto implican vías tumorales diferentes²⁵².

Sin embargo, otros como el de Lapointe del 2007, coincide con nosotros, no encontrando relación entre la presencia del gen de fusión y un Gleason desfavorable²⁴⁰.

Gopalan en 2009 presenta sus resultados, tras llevar a cabo la detección del gen de fusión mediante FISH y no encuentra que la presencia del mismo (siendo positivo en el 42%

de los pacientes con CaP) se asocia al Gleason, estadio, RBq, metástasis ni muerte²⁴⁶.

En esta misma línea van los resultados del grupo de Fine, donde observan que la fusión de TMPRSS2-ERG no se asocia con el score de Gleason³⁶³. Otros trabajos solo encuentran asociación del gen de fusión con el estadio tumoral^{200,241}.

En cuanto a significación pronóstica, evaluada en la mayor parte de los casos como la tasa de recurrencia bioquímica, también encontramos resultados dispares, mostrando algunos autores una mayor tasa de recurrencia cuando existe la fusión génica^{135,142}, e incluso una mayor probabilidad de progresión y mayor MCE^{241,243}.

En un estudio que evaluaba una cohorte de pacientes con CaP a los que se seguían para manejo conservador, se evaluó la presencia del gen de fusión así como la mortalidad cáncer específica, observando que aquellos pacientes con fusión positiva presentaban un mayor riesgo de muerte por CaP²⁴³.

Coincidiendo con nuestros resultados, diferentes autores no encontraron asociación entre la presencia del gen de fusión y el pronóstico^{246,247}, es más, el grupo de Saramäki encuentra que aquellos pacientes con la presencia del gen de fusión tienen un pronóstico más favorable, sin encontrar asociación con factores relacionados con el pronóstico como el Gleason, el estadio tumoral o el PSA preoperatorio²⁴⁴.

En otros trabajos en la misma línea, observan una supervivencia libre de recurrencia mayor en los casos de fusión positiva^{135,245}.

De esta manera, parece ser que la utilidad del gen de fusión como marcador pronóstico sigue siendo una incógnita. Es posible que sean necesarios trabajos con cohortes prospectivas con mayor número de pacientes que clarifiquen la significación pronóstica de la fusión génica.

4. METILACIÓN DEL GEN PITX2

Es sabido que la metilación de determinados genes y su consecuente inactivación, contribuye al desarrollo del CaP³⁶⁴ y una creciente evidencia indica que la metilación tiene un importante potencial en la mejora del diagnóstico del CaP³⁶⁵. Además, se ha sugerido que la epigenética puede aportar información pronóstica adicional o complementaria a otras técnicas como pueden ser la inmunohistoquímica u otros marcadores moleculares como es el gen de fusión. La ventaja de este método es que cuenta con la estabilidad del ADN y que no es una técnica excesivamente cara, por lo que podría ser una herramienta pronóstica con una consistencia científica mayor.

Con el presente trabajo pretendemos aportar alguna evidencia más sobre la metilación del ADN como marcador pronóstico, en concreto para el gen PITX2. La decisión de elegir este gen se obtuvo tras realizar una búsqueda bibliográfica, donde evidenciamos que el PITX2 aparecía en la mayoría de los trabajos publicados como un buen marcador pronóstico en el CaP. Este gen expresa una proteína que actúa como factor de transcripción, involucrada en el desarrollo de gran cantidad de órganos. La expresión de PITX2 es inducida por la vía Wnt y la proteína mediará la proliferación celular activando los genes encargados de la regulación del crecimiento celular³⁶⁶. Cuando este gen aparece hipermetilado conduce a una silenciamiento génica y por lo tanto una disminución de la expresión de la proteína PITX2, hecho que se asocia al CaP³⁶⁷.

Hay que explicar antes de pasar a comentar los resultados, que los niveles de metilación del PITX2 que hemos obtenido son relativamente bajos. En las series de otros autores, en muchas ocasiones no establecen los valores medios o no establecen puntos de corte para definir cuándo el gen está hiper o hipometilado. En caso de hacerlo, no especifican cuál es, por lo que hace complicado comparar nuestros resultados con los de otras series. De hecho, en algunos casos se opta por la no dicotomización de los valores, es decir, no indicar un punto de corte, sino que utilizan el valor continuo obtenido para la metilación. En cualquier caso, es éste un tema conflictivo, pues si el objetivo es estandarizar este marcador, debería homogeneizarse el nivel de metilación considerado como elevado, ya que este contrapunto puede suponer que los resultados entre series sean diferentes.

En nuestro trabajo hemos considerado la mediana como punto de corte, de forma que aquellos valores por debajo los hemos clasificado como hipometilados y los que estaban por encima como hipermetilados. Los resultados que obtenemos en el segmento CpG1 son concordantes con los hallados en la literatura, de forma que la hipermetilación de este segmento del gen PITX2 implica un peor pronóstico en términos de RBq en el CaP.

En el 2009 y 2010 Weiss i Bañez publican los dos estudios más importantes al respecto, en los cuales se muestra que aquellos pacientes con CaP que presentan el gen PITX2 hipermetilado muestran tres veces más probabilidad de recaer. Lo mismo ocurre en nuestro estudio, donde los pacientes que presentan el gen PITX2 hipermetilado tienen cerca de dos veces más de probabilidades de presentar una RBq.

En el caso del estudio de Weiss i cols. se estudian varios genes además del PITX2. Se trata de una cohorte de 605 pacientes de los que se cogen muestras de las piezas de PR, igual que en nuestro estudio FFPE y observan que entre otros, el PITX2 se asocia de forma significativa a la RBq, siendo el marcador más fuertemente seleccionado, aportando

información pronóstica adicional a los ya clásicamente conocidos, especialmente en pacientes con un riesgo intermedio, y Gleason 7. Aquellos pacientes con una mediana superior tienen cuatro veces más de probabilidad de tener una recidiva bioquímica. Concluyen por tanto que la metilación del PITX2 aporta información pronóstica de interés²⁷⁴. En relación a los grupos de riesgo, en nuestra serie observamos que cuando el estudio de supervivencia lo estratificamos según esta variable, obtenemos que la metilación del gen PITX2 obtiene una mayor rentabilidad en el grupo de bajo riesgo. A diferencia de lo comentado, otros trabajos apuntan a la utilidad del PITX2 en aquellos casos de CaP de alto riesgo³⁶⁸. En nuestro caso la escasa utilidad hallada en este grupo de pacientes puede deberse al escaso número incluido.

En el estudio de Bañez, también son pacientes intervenidos de PR y se pretende ver qué relación existe entre la metilación del gen PITX2 y la probabilidad de recaer. Para ello, emplean un total de 476 muestras de próstatas en bloques FFPE. Utilizan el EpiChip con microarrays, observando que aquellos pacientes con un mayor estatus de metilación, presentan un mayor riesgo de RBq (HR 3, IC 95%:2-4,5, $p < 0,00001$)³⁶⁹.

Estos resultados serán corroborados posteriormente por Vanaja, el cual aporta que además de la RBq, aquellos pacientes que presentan hipermetilación del gen PITX2 tienen un mayor riesgo de recaída sistémica²⁷⁵.

En cuanto al método utilizado, básicamente todos los trabajos al respecto utilizan la qPCR para la medición de la metilación del PITX2. Un estudio conducido por Dietrich tiene como objetivo la validación de este método, pues es accesible para muchos laboratorios, con lo que puede ayudar a la implementación de este marcador en la práctica clínica. Obtienen en este estudio que la hipermetilación de PITX2 es un buen predictor de recurrencia bioquímica (HR:2,6, $p < 0,001$) cuando es realizado por qPCR, es más, que este marcado epigenético, añade información pronóstica al Gleason, estadio patológico, PSA y márgenes quirúrgicos en el análisis multivariante. Esta utilidad aumenta para los casos de Gleason 7, tal y como hemos visto en otros trabajos²⁷⁶. También en nuestro caso obtenemos resultados en esta línea, pues observamos que la metilación del PITX2 es más útil en el grupo de pacientes con Gleason ≤ 7 . Esta asociación con diferentes grupos de Gleason también la han publicado otros autores, encontrando que el PITX2 hipermetilado presenta una significación importante para Gleason bajos a la hora de precedir el riesgo de muerte por cáncer específica en este grupo de pacientes²⁷⁷.

Por otro lado, uno de los objetivos del trabajo era establecer la posible relación entre la metilación del gen PITX2 y el gen de fusión, así como la expresión de ERG. Tras el descubrimiento del gen de fusión TMPRSS2-ERG, y su probabilidad de estar implicado en el desarrollo inicial de CaP, se postula que la etiología tumoral, así como el perfil epigenético

sean diferentes dependiendo de la positividad del gen de fusión. De esta manera, las vías moleculares de desarrollo tumoral son diferentes en los casos de expresión de ERG (considerando que es comparable a la positividad del gen de fusión) que aquellos tumores que no la expresan (en torno al 50%). En relación a la metilación de PITX2 y la expresión de ERG, diferentes trabajos han mostrado que la expresión de este marcador se asocia a la hipermetilación de diferentes genes implicados en el CaP³⁷⁰, entre ellos el gen PITX2, pues es sabido que la hipermetilación de este gen conduce a cambios moleculares en el CaP, como la activación oncogénica de ERG en la mitad de los casos³⁶⁷.

En nuestro caso, no hemos encontrado asociación entre la metilación del gen PITX2 y la presencia del gen de fusión TMPRSS2-ERG, pero sí con la expresión de ERG. Observamos que la hipermetilación del segmento CpG7 parece estar asociada a la sobreexpresión de ERG, no así el resto de CpGs. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se lleva a cabo, por lo que es difícil justificar el por qué de estos resultados³⁷⁰.

Con todo ello, podemos decir que según nuestros resultados, la metilación del gen PITX2 puede aportar información pronóstica en el cáncer de próstata, mostrándose como factor predictor de la RBq, de forma que puede ayudar a determinar perfiles concretos de riesgo que permitan personalizar el tratamiento para cada paciente con CaP.

Como limitaciones fundamentales del estudio podemos considerar, en primer lugar, que dado el contexto en el que se realiza el estudio, tenemos un escaso número de pacientes en el grupo de alto riesgo, como ya hemos comentado, por ser derivados a tratamiento combinado con HT y RT. Dado que hoy en día cada vez más pacientes con alto riesgo se incluyen para prostatectomía radical, estaría bien determinar el pronóstico específico de estos pacientes.

En segundo lugar, que se trata de un estudio retrospectivo y realizado sobre piezas de PR. Sería conveniente realizar un trabajo prospectivo donde el test se determinara previo al diagnóstico de CaP, es decir, en muestras de sangre/orina o bien en la biopsia prostática.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir:

1. Los marcadores inmunohistoquímicos en el CaP localizado que más se expresan son el PSA, la FAP y el PSMA, siendo la proteína p53 la que aparecen expresada en menor proporción.
2. La frecuencia de presentación de la fusión génica TMPRSS2-ERG en nuestra serie de pacientes con CaP localizado es del 56%.
3. La frecuencia de expresión inmunohistoquímica del marcador ERG en pacientes con CaP localizado es del 35%.
4. Existe una correlación baja en nuestra serie entre la qPCR para el gen de fusión TMPRSS2-ERG y la expresión inmunohistoquímica de ERG.
5. La expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos en pacientes con CaP que han sido tratados mediante PR, se relaciona con diferentes parámetros clínico-patológicos, indicando su relación con el pronóstico de la enfermedad, como son:
 - El aumento de la expresión de la proteína p53, relacionada con un Gleason más indiferenciado, estadios patológicos más avanzados, IPN y RBq.
 - La FAP pierde su expresión en estadios clínicos más avanzados.
 - Hay una pérdida de expresión del RA en aquellos casos con una puntuación total de Gleason más elevado.
 - La expresión de PSMA aumenta en aquel grupo de pacientes que progresan y requieren tratamiento hormonal.
6. El gen de fusión TMPRSS2-ERG analizado mediante qPCR en esta población de pacientes estudiada, no presenta relación con ninguna de las variables clínico-patológicas.
7. La metilación del gen PITX2 muestra una asociación con la RBq. En el análisis multivariante de supervivencia, respecto al intervalo libre de RBq, la metilación del gen PITX2 aparece como marcador pronóstico independiente, junto con los grupos de riesgo, estadiaje y la presencia de ganglios positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Center MM, Jemal A, Lortet-Tiulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer. Incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012 Jun;61(6):1079-92.
2. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, 25 Urology Units, Asociación Española de Urología, Cantalapiedra A, Pedrosa E. Prostate cancer incidence and newly diagnosed patient profile in Spain in 2010. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt B):E701-6) *Actas Urológicas Esp* 2013 Jan;37(1):12-19.
3. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol* 2012 Apr;30(2):143-8.
4. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr;13 Spec No1:R103-21.
5. Richman EL, Kenfield SA, Stampfer MJ, et al. Egg, red meat, and poultry intake and risk of lethal prostate cancer in the prostate-specific antigen-era: incidence and survival. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Dec;4(12):2110-21. (Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004 Nov;101(10 Suppl): 2371-490.
6. Boyle P, Severi G, Giles GG. The epidemiology of prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 2003 May;30(2):209-17.
7. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2013 Feb;36(2):132-9).
8. Xu H, Jiang HW, Ding GX, Zhang H, Zhang LM, Mao SH, Ding Q. Diabetes mellitus and prostate cancer risk of different grade or stage: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013 Mar;99(3):241-9.
9. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquification of human semen. *J Clin Invest*. 1987 Aug;80(2):281-5.
10. Morote J, Segura RM, de Torres JA, Soler-Roselló A. Behavior of prostate-specific antigen (PSA) in prostate tissue: correlation with prostatic acid phosphatase (PAP). *Actas Urol Esp*. 1987 Mar-Apr;11(2):180-3.

11. Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology*. 2001 Dec;58(6):843-8.
12. Thomson I, Pauler D, Goodman P, Tangen C, Lucia M, Parnes H, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004 May;350(22):2239-46.
13. 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.
14. Carter B, Pearson JD, Metter J, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate diseases. *JAMA*. 1992 Apr;267(16):2215-20.
15. Yu X, Han M, Loeb S, Gashti SN, Yeh JT, Roehl KA, Catalona WJ. Comparison of methods for calculating prostate specific antigen velocity. *J Urol*. 2006 Dec;176(6):2427-31.
16. Llorente C, de la Morena JM, Ardaura MA. PSA doubling time as a new diagnostic method for prostate cancer. *Arch Esp Urol*. 2006 Dec;59(10):1083-7.
17. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girmannm CJ, Panser LA, Lieber MM. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 1993 Aug; 270(7):860-4.
18. McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, Lilja H, Oesterling JE. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology*. 1995 May;45(5):729-44.
19. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J Urol*. 1998 Jan;159(1): 5-12.
20. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993 Oct;42(4):365-74.
21. Nash PA, Bruce JE, Indudhara R, Shinohara K. Transrectal ultrasound guided prostatic nerve blockade eases systematic needle biopsy of the prostate. *J Urol*. 1996 Feb;155(2):607-9.

22. Remzi M, Fong YK, Dobrovitz M, Anagnostou T, Seitz C, Waldert M, Harik M, Marihart S, Marberger M, Djavan B. The Viena nomogram: validation of a novel biopsy strategy defining the optimal number of cores base don patient age and total prostate volumen. *J Urol*. 2005 Oct;174(4 Pt 1):1256-61.
23. Edge SB, Byrd CC, Compton AG, Fritz FL, Greene A, Trotti editores. *AJCC cancer staging manual (7.^a)* Springer, Chicago. 2010.
24. Jager GJ, Severens JL, Thornbury JR, de la Rosette JJ, Ruijs SH, Barentsz JO. Prostate cancer staging: should MR imaging be used? A decision analytic approach. *Radiology* 2000 May;215(2):445- 51.
25. Masterson TA, Touijer K. The role of endorectal coil MRI in preoperative staging and decision-making for the treatment of clinically localized prostate cancer. *MAGMA* 2008 Nov;21(6):371-7.
26. Mullerad M, Hricak H, Kuroiwa K, Pucar D, Chen HN, Kattan MW. Comparison of endorectal magnetic resonance imaging, guided prostate biopsy and digital rectal examination in the preoperative anatomical localization of pros- tate cancer. *J Urol* 2005 Dec;174(6):2158-63.
27. Sala E, Akin O, Moskowitz CS, Eisenberg HF, Kuroiwa K, Ishill NM, Rajashanker B, Scardino PT, Hricak H. Endorectal MR imaging in the evaluation of seminal vesicle invasion: diagnostic accuracy and multivariate feature analysis. *Radiology* 2006 Mar;238(3):929-37.
28. Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Yu KK, Sokolov DL, Huang LR, Zaloudek CJ, Nelson SJ, Carroll PR, Kurha- newicz J. Prostate cancer: localization with three-dimensional proton MR spectroscopic imaging clinicopathologic study. *Radiology* 1999;213(2):473-80.
29. Narayan P, Fournier G, Gajedran V, Leidich R, Lo R, Wolf J, Jacob G, Nicolaisen G, Palemr K, Freiha F. Utility of preoperative serum prostatic antigen concentration and biopsy Gleason score in predicting risk of pelvic lymph node metastases in prostate cáncer. *Urology*. 1994 Oct;44(4):519-24.
30. Kazzazi A, Djavan B. Current status of pelvic node dissection in prostate cancer: the New York PLND nomogram. *Can J Urol*. 2011 Apr;18(2):5585-91.
31. Eifler JB, Feng Z, lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, Epstein JI, Walsh PC, Trock BJ, Partin AW. An updated prostate cancer staging nomogtam (Partin tables) base don cases from 2006 to 2011. *BJU Int*. 2013 Jan;111(1):22-9.

32. Hoivels AM, Heesakkers RAM, Adang EM., Jager GJ, Strum S, Hoogeveen YL, Severens JL, Barentsz JO. The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2008 Apr;63(4):387-95.
33. Jager GJ, Barentsz JO, Oosterhof GO, Witjes JA, Ruijs SJH. Pelvic adenopathy in prostatic and urinary bladder carcinoma: MR-imaging with a three-dimensional T1-weighted magnetizationprepared- rapid gradient-echo sequence. *Am J Roentgenol*. 1996 Dec;167(6):1503-7.□
34. Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, de la Rosette J, Weissleder R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jun;348(25):2491-9.
35. Salminen E, Hogg A, Binns D, Frydenberg M, Hicks R. Investigations with FDG-PET scanning in prostate cancer show limited value for clinical practice. *Acta Oncol*. 2002;41(5):425-9.
36. Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE. Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? *J Urol*. 2002 Aug;168(2):514-18).
37. (Weckermann D, Dorn R, Trefz M, Wagner T, Wawroschek F, Harzmann R. Sentinel lymph node dissection for prostate cancer: experience with more than 1,000 patients. *J Urol*. 2007 Mar;177(3): 916-20.
38. Bouchelouche K, Oehr P. Recent developments in urologic oncology: positron emission tomography molecular imaging. *Curr Opin Oncol*. 2008 May;20(3):321-6.□
39. (Rana A, Karamanis K, Lucas MG, Chisholm GD. Identification of metastatic disease by T category, Gleason score and serum PSA level in patients with carcinoma of the prostate. *Br J Urol*. 1992 Mar;69(3):277-81).
40. Wolff JM, Zimny M, Borchers H, Wildberger J, Buell U, Jakse G. Is prostate-specific antigen a reliable marker of bone metastasis in patients with newly diagnosed cancer of the prostate? *Eur Urol*. 1998;33(4):376-81.
41. Wolff JM, Bares R, Jung PK, Buell U, Jakse G. Prostate-specific antigen as a marker of bone metastasis in patients with prostate cancer. *Urol Int* 1996;56(3):169-73.□
42. D'Amico, Whittington R, Malkowicz B, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998 Sep;280(11):969-74.
43. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™). Prostate Cancer.

44. Dugan JA, Bostwick DG, Myers RP, Qian J, Bergstralh EJ, Oesterling JE. The definition and preoperative prediction of clinically insignificant prostate cancer. *JAMA* 1996 Jan;275(4):288-94.
45. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of non palpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 1994 Feb;271(5):368-74.
46. Bastian PJ, Mangold LA, Epstein JI, Partin AW. Characteristics of insignificant clinical T1c prostate tumors. A contemporary analysis. *Cancer*. 2004 Nov;101(9):2001-5.
47. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. International agency for research on cancer (IARC Press). Lyon 2004.
48. Gleason, D. F.: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, 23: 273, 1992.
49. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP grading committee. The 2005 International Society of Urologic Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep;29(9):1228-42.
50. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol*. 2010 Feb;183(2):433-40.
51. Abdel-Khalek M, El-Baz M, Ibrahim el-H. Predictors of prostate cancer on extended biopsy in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a multivariate analysis model. *BJU Int*. 2004 Sep;94(4):528-33.
52. Vis A, Hoedemaeker RF, Roobol M, Schröder FH, van der Kwast TH. The predictive value for prostate cancer of lesions that raise suspicion of concomitant carcinoma. *Cancer*. 2001 Aug;92(3):524-34.
53. Epstein JI, Herawi M. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: Implications for patient care. *J Urol*. 2005 Mar;175: 820-34.
54. Borboroglu PG, Sur RL, Roberts JL, Amling CL. Repeat biopsy strategy in patients with atypical small acinar proliferation or high grade prostatic intraepithelial neoplasia on initial prostate needle biopsy. *J Urol*. 2001 Sep;166(3): 866-70.
55. Epstein JI: Pathologic assessment of the surgical specimen. *Urol Clin North Am*. 2001 Aug;28(3):567-94.
56. Fesseha T, Sakr W, Grignon D, Banerjee M, Wood DP Jr, Pontes JE. Prognostic

- implications of a positive apical margin in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 1997 Dec;158(6):2176-2179.
57. Mithal P, Howard LE, Aronson WJ, Terris MK, Cooperberg MR, Kane CJ, Amling C, Freedland SJ. Positive surgical margins in radical prostatectomy patients do not predict long-term oncological outcomes: results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital (SEARCH) cohort. *BJU Int.* 2015 May 24. doi:10.1111/bju.13181.
 58. Pettenati C, Neuzillet Y, Radulescu C, Hervé JM, Molinié V, Lebreton T. Positive surgical margins after radical prostatectomy: What should we care about? *World J Urol.* 2015 May5.
 59. Ayala GE, Dai H, Ittmann M, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 Sep;64(17):6082-90.
 60. Ayala GE, Dai H, Tahir SA, Li R, Timme T, Ottmann M, Frolov A, Wheeler TM, Rowley D, Thompson TC. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res* 2006 May;66(10):5159-64.
 61. Morash C, Tey R, Agbassi C, Klotz L, McGowan T, Srigley J, Evans A. Active surveillance for the management of localized prostate cancer: guideline recommendations. *Can Urol Assoc J.* May-Jun;9(5-6):171-8.
 62. European Association Guidelines 2015. Mottet N(chair), Bellmunt J, Briers E, van den Bergh RCN, Bolla M, van Casteren NJ, Cornford P, Culine S, Joniau S, Lam T, Mason MS, Matveev V, van der Poel H, van der Kwast TH, Rouvière O, Wiegel T.
 63. Walz J, Joniau S, Chun FK, Isbam H, Jeldres C, Yossepowitch O, Chao-Yu H, Klein EA, et al. Pathological results and rates of treatment failure in high-risk prostate cancer patients after radical prostatectomy. *BJU Int.* 2011 Mar;107(5):765-70.
 64. Briganti A, Karnes JR, Da Pozzo LF, Cozzarini C, Gallina A, Suardi N, Bianchi M, Freschi M, et al. Two positive nodes represent a significant cut-off value for cancer specific survival in patients with node positive prostate cancer. A new proposal based on a two-institution experience on 703 consecutive N+ patients treated with radical prostatectomy, extended pelvic lymph node dissection and adjuvant therapy. *Eur Urol.* 2009 Feb;55(2):261-70. □
 65. Consensus statement: the management of clinically localized prostate cancer. National Institutes of Health Consensus Development Panel (no authors listed). *NCI Monogr.* 1988;(7):3-6. □
 66. Zaorsky NG, Harrison AS, Trabulsi EJ, Gomella LG, Showalter TN, Dicker AP,

- Den RB. Evolution of advanced technologies in prostate cancer radiotherapy. *Nat Rev Urol*. 2013 Oct;10(10):565-79.
67. Blasko JC, Mate T, Sylvester JE, Grimm PD, Cavanagh W. Brachytherapy for the carcinoma of the prostate: techniques, patient selection and clinical outcomes. *Semin Radiat Oncol*. 2002 Jan;12(1):81-94.
68. Seidenfeld J, Samson DJ, Hasselblad V, Aronson N, Albertsen PC, Bennett CL, Wilt TJ. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2000. Apr;132(7):566-77.
69. Van Poppel H, Tombal B, de la Rosette JJ, Persson BE, Jensen JK, Kold Olesen T. Degarelix: a novel gonado- tropin-releasing hormone (GnRH) receptor blocker—results from a 1-yr, multicentre, randomised, phase 2 dosage- finding study in the treatment of prostate cancer. *Eur Urol*. 2008 Oct;54(4):805-13.
70. Boccardo F, Barichello M, Battaglia M, Carmignani G, Comeri G, Ferraris V, Lilliu S, Montefiore F, Portoghese F, Cortellini P, Rigatti P, Usai E, Rubagotti A. Bicalutamide monotherapy versus flutamide plus goserelin in prostate cancer: updated results of a multicentric trial. *Eur Urol*. 2002 Nov;42(5): 481-90.
71. Loblaw DA, Mendelson DS, Talcott JA, Virgo KS, Somerfield MR, Ben-Josef E, Middleton R, Porterfield H, Sharp SA, Smith TJ, Taplin ME, Vogelzang NJ, Wade JL Jr, Bennett CL, Scher HI: American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jul;22(14):2927-41.
72. Madersbacher S, Marberger M. High-energy shockwaves and extracorporeal high-intensity focused ultrasound. *J Endourol*. 2003 Oct;17(8):667-72.□
73. Long JP, Bahn D, Lee F, Shinohara K, Chinn DO, Macaluso JN Jr. Five-year retrospective, multiinstitutional pooled analysis of cancer-related outcomes after cryosurgical ablation of the prostate. *Urology*. 2001 Mar;57(3):518-23.
74. Onik G, Miessau M, Bostwick DG. Three-dimensional prostate mapping biopsy has a potentially significant impact on prostate cancer management. *J Clin Oncol* 2009 Sep;10:27(26):4321-6.
75. Poissonnier L, Chapelon JY, Rouviere O, Curiel L, Bouvier R, Martin X, Dubernard JM, Gelet A. Control of prostate cancer by transrectal HIFU in 227 patients. *Eur Urol*. 2007 Feb;51(2):381-7.
76. Bahn DK, Lee F, Baldalament R, Kumar A, Greski J, Chernick M. Targeted

- cryoablation of the prostate: 7-year outcomes in the primary treatment of prostate cancer. *Urology*. 2002 Aug;60(2 Suppl 1).
77. Han K, Cohen J, Miller R, Pantuck AJ, Freitas DG, Cuevas CA, Kim HL, Lugg J, Childs SJ, Shuman B, Jayson MA, Shore ND, Moore Y, Zisman A, Lee JY, Ugarte R, Mynderse LA, Wilson TM, Sweat SD, Zincke H, Beldegrun AS. Treatment of organ confined prostate cancer with third generation cryosurgery: preliminary multicentre experience. *J Urol*. 2003 Oct;170(4Pt1):1126-30.
78. Marshall S, Taneja S. Focal therapy for prostate cancer: The current status. *Prostate Int*. 2015 Jun;3(2):35-41.
79. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol*. 2006 Aug;24(24):3973-8.
80. Roach III M, Hanks G, Thames jr H, Schelhammer P, Shipley WU, Sokol GE, Sandler H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix consensus conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Jul;65(4):965-74.
81. Aus G. Current status of HIFU and cryotherapy in prostate cancer: a review. *Eur Urol*. 2006 Nov;50(5): 927-34.
82. Oefelein MG, Feng A, Scolieri MJ, Ricchiutti D, Resnick MI. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology*. 2000 Dec;56(6):1021-4.
83. Morote J, Esquena S, Abascal JM, et al. Failure to maintain a suppressed level of serum testosterone during long-acting depot luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy in patients with advanced prostate cancer. *Urol Int*. 2006;77(2):135-8.
-
84. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 May;90(10):766-71.
85. 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.
86. Quinn DI, Henshall SM, Brenner PC, et al. Prognostic significance of preoperative factors in localized prostate carcinoma treated with radical prostatectomy: importance

- of percentage of biopsies that contain tumor and the presence of biopsy perineural invasión. *Cancer*. 2003 Apr;97(8):1884-93.
87. Arlen PM, Bianco F, Dahut WL, et al. Prostate specific antigen working group. Prostate specific antigen working group guidelines on prostate specific antigen doubling time. *J Urol*. 2008 Jun;179(6):2181-5.
88. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, Sinnott JA, Finn S, Eisenstein AS, Ma J, Fiorentino M, Kurth T, Loda M, Giovannicci EL, Rubin MA, Mucci LA. Gleason score and lethal prostate cancer: does $3 + 4 = 4 + 3$? *J Clin Oncol*. 2009 Jul; 27(21):3459-64.
89. Marks M, Koch MO, Lopez-Beltran A, et al. The relationship between the extent of surgical margins positivity and prostate specific antigen recurrence in radical prostatectomy specimens. *Hum Pathol* 2007 Aug;38(8):1207-11.
90. Harnden P, Shelley MD, Clements H, et al. The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review. *Cancer*. 2006; 109:13-24.
91. Ng JC, Koch MO, Daggy JK, Cheng L. Perineural invasion in radical prostatectomy specimens: lack of prognostic significance. *J Urol*. 2004 Dec; 172(6 Pt 1):2249-51.
92. D'Amico AV, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, and Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2001 Jan;165(1): 126-9.
93. Boorjian SA, Karnes RJ, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Blute ML. Mayo Clinic validation of the D'Amico risk group classification for predicting survival following radical prostatectomy. *The Journal of urology*. 2008 Apr;179(4):1354-60.
94. Den RB, Yousefi K, Trabulsi EJ, Abdollah F, Choemug V, et al. Genomic classifier identifies men with adverse pathology after radical prostatectomy who benefit from adjuvant radiation therapy. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 10;33(8):944-51.
95. Klein EA, Yousefi K, Haddad Z, Choemug V, Buerki C, Stephenson AJ, Li J, Kattan MW et al. A genomic classifier improves prediction of metastatic disease within 5 years after surgery in node-negative high-risk prostate cancer patients managed by radical prostatectomy without adjuvant therapy. *Eur Urol*. 2015 Apr;67(4):778-86.
96. Mora MJ. Role of tissue markers on diagnosis, prognosis and monitoring of prostate cancer. *Arch Esp Urol*. 2015 Apr;68(3):250-66.
97. Cary KC, Cooperberg MR. Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present and future. *Ther Adv Urol*. 2013 Dec;5(6):318-29.
98. (Esfahani M, Ataei N, Panjehpour M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer

- prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):2601-11.
99. Ryan CJ, Smith MR, Bono JS, et al. COU-AA-302 Investigators et al. Abiraterone in metastatic prostatic cancer previous chemotherapy. *N Engl J Med.* 2013 Jan; 368(2):138-48.
100. Bhavsar T, McCue P, Birbe R. Molecular diagnosis of prostate cancer: Are we up to age? *Semin Oncol.* 2013 Jun;40(3):259-75.
101. Molinié V, Baumert H. New markers in prostate biopsies. *Actas Urol Esp.* 2007;31(9):1009-1024.
102. Zelivianski S, Corneau D, Lin MF. Cloning and analysis of the promoter activity of the human prostatic acid phosphatase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr;245(1):108-12.
103. Graddis TJ, McMahan CJ, Tamman J, Page K, Trager J. Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011 Mar;4(3):295-306.
104. Ahmann FR, Schifman RB. Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostate cancer. *J Urol.* 1987 Mar;137(3):431-4.
105. Lin M, Lee M, Zhou X, Andressen JC, Meng TC, Johansson SL, West WW, Taylor RJ, Anderson JR, Lin FF. Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increases tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Urol.* 2001 Nov;166(5):1943-50.
106. Foti AG, Cooper JF, Herschman H, Malvaez RR. Detection of prostatic cancer by solid-phase radioimmunoassay of serum prostatic acid phosphatase. *N Engl J Med.* 1977 Dec;297(25):1357-61.
107. Taira A, Merrick G, Wallner K, Datolli M. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park).* 2007 Jul;21(8):1003-10.
108. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jul;363(5):411-22.
109. Varma M, Morgan M, Jasani B, Tamboli P, Amin MB. Polyclonal anti-PSA is more sensitive but less specific than monoclonal anti-PSA: Implications for diagnostic prostatic pathology. *Am J Clin Pathol.* 2002 Aug;118(2):202-7.
110. Goldstein NS. Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores. *Am J Clin Pathol.* 2002

- Mar;117(3):471-7.
111. Schmitz W, Abers C, Fingerhut R, Conzelmann E. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem.* 1995 Aug;231(3): 815-22.
 112. Xu J, Stolck JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Reed SG. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarrays. *Cancer Res.* 2000 Mar;60(6):1677-82.
 113. Evans, AJ. Alpha-methylacyl CoA racemase (p504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J Clin Pathol.* 2003 Dec;56(12):892-7.
 114. Zheng SL, Chang BL, Faith DA, Johnson JR, Isaacs SD, Hawkings GA, Turner A, Wiley KE, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. Sequence variants of alpha-methylacyl-CoA racemase are associated with prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2002 Nov;62(22):6485-8.
 115. Rubin MA, Zhong M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002 Apr;287(13):1662-70.
 116. Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennetti CJ, Ewing CM, Platz EA, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Trent JM, Isaacs WB, De Marzo AM. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 2002 Apr;62(8):2220-6.
 117. Leav I, McNeal JE, Ho SM, Jiang Z. Alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) expression in evolving carcinomas within benign prostatic hyperplasia and its cancer of transition zone. *Hum Pathol.* 2003 Mar;34(3):228-33.
 118. Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yazij H, Salles PG, Grignon DJ, Fanger GR, Amin MB. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2002 Dec;26(12):1588-96.
 119. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-Racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers?. *Am J Surg Pathol.* 2004 Feb;28(2):239-43.
 120. Leroy X, Aubert S, Villers A, Ballereau C, Augusto D, Gosselin B. Minimal focus of adenocarcinoma on prostate biopsy : clinicopathological correlations. *J Clin Pathol.*

- 2003 Mar;56(3):230-2.
121. Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol.* 2003 Aug;27(8):1128-33.
 122. Moline V, Fromont G, Sibony M, Vieillefond A, Vassillu V, Cochand-Priolet B, Hervé JM, Leuret T, Baglin AC. Diagnostic utility of a p63/alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) cocktail in atypical foci in the prostate. *Mod Pathol.* 2004 Oct;17(10):1180-90.
 123. Kuefer R, Varambally S, Zhou M, Lucas PC, Loeffler M, Wolter H, Maltfield T, Hautmann RE, Gschwend JE, Barrette TR, Dunn RL, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Alpha-Methylacyl-CoA Racemase: expression levels of this novel cancer biomarker depend on tumor differentiation. *Am J Pathol.* 2002 Sep;161(3):841-8.
 124. Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, Pihan G, Cai F, Babcook JS, Rathanaswami P, Reed SG, Xu J, Fanger GR. P504S: A new marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001 Nov;25(11):1397-404.
 125. Martens MB, Keller JH. Routine immunohistochemical staining for high-molecular weight cytokeratin 34-beta and alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) in postirradiation prostate biopsies. *Modern Pathol.* 2006 Feb;19(2):287-90.
 126. Huggings C, Stephens RC, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: the effects of castration on advance carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg.* 1941;43:209-223.
 127. Maggiolini M, Vivacqua A, Carpino A, Bonofiglio D, Fasanella G, Salerno M, Picard D, Ando S. The mutant androgen receptor T877A mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of genistein and quercetin on human LNCaP prostate cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2002 Nov;62(5):1027-35. □
 128. Cabral DF, Santos A, Ribeiro ML, Mesquita JC, Carvalho-Salles AB, Kackel C. Rarity of DNA sequence alterations in the promoter region of the human androgen receptor gene. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Dec;37(12):1789-94.
 129. Sánchez Zalabardo D, Rosell Costa D, Honorato Cia B, Rioja Zuazu J, Regojo Balboa JM, Fernández Montero JM, López Ferrandis J, et al. Human androgen receptor gene mutations in patients with clinically localized prostate cancer. *Actas Urol Esp.* 2004 Mar;28(3):221-9.
 130. Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2002 Dec;187(1-2):1-7. □

131. Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg, W. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med (Berl)*. 1999 May;77(5):419-26.
132. Culig, Z, Stober J, Gast A, Peterziel H, Hobisch A, Radmayr C, Hittmair A, Bartsch G, Cato AC, Klocker H. Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev*. 1996;20(1):68-75. □
133. Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res*. 1995 Jul;55(14):3068-72. □
134. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jul;8(7):497-511.
135. 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;24(23):3847-52.
136. Furusato B, Tan SH, Young D, Dobi A, Sun C, Mohamed AA, Thangapazham R, Chen Y, McMaster G, Sreenath T, Petrovics G, McLeod DG, Srivastava S, Sesterhenn IA. ERG oncoprotein expression in prostate cancer: clonal progression of ERG-positive tumor cells and potential for ERG-based stratification. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010 Sep;13(3):228-37.
137. Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM, Chiu YL, Esgueva R, Mehra R, et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia*. 2010 Jul;12(7):590-8.
138. Rosen P, Pfister D, Young D, Petrovics G, Chen Y, Cullen J, Böhm D, Perner S, Dobi A, McLeod DG, Sesterhenn IA, Srivastava S. Differences in frequency of ERG oncoprotein expression between index tumors of caucasian and african american patients with prostate cancer. *Urology*. 2012 Oct;80(4):749-53.
139. Shah RB. Clinical applications of novel ERG immunochemistry in prostate cancer diagnosis and management. *Adv Anat Pathol*. 2013 Mar;20(2):117-24.
140. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
141. Chesire DR, Isaacs WB. Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Dec;10(4):537-60.

142. Gregokaris AK, Holmes EH, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen: current and future utility. *Semin Urol Oncol*. 1998 Feb;16(1):2-12.
143. Murphy GP, Kenny GM, Ragde H, Wolfert RL, Boynton AL, Holmes EH, Misrock SL, Bartsch G, Klocker H, et al. Measurement of serum prostate-specific membrane antigen, a new prognostic marker for prostate cancer. *Urology*. 1998 May;51(5A Suppl):89-97.
144. Murphy GP, Barren RJ, Erickson SJ, Bowes VA, Wolfert RL, Bartsch G, Klocker H, Pointner J, Reissigl A, McLeod DG, Padilla M, Caballero J, Rodrigo I, García J, Quian J, Boswick DG. Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. Free-prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. *Cancer*. 1996 Aug;78(4):809-18.
145. Marchal C, Redondo M, Padilla M, et al. Expression of prostate specific membrane antigen (PSMA) in prostate adenocarcinoma and prostate intraepithelial neoplasia. *Histol Histopatol*. 2004 Jul;19(3):715-8.
146. Xu T, Chen X, Wang XF, Hou SK, Zhu JC, Zhang XD, Huang XB. Study of PSA, PSMA and hK2 mRNA in peripheral blood of prostate cancer patients and its clinical implications. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2004 Apr;36(2):164-8.
147. Su SL, Boynton AL, Holmes EH, Elgamal AA, Murphy GP. Detection of extraprostatic prostate cells utilizing reverse transcription-polymerase chain reaction. *Semin Surg Oncol*. 2000 Jan-Feb;18(1):17-28.
148. Lopes AD, Davis WL, Rosentraus MJ, Uveges AJ, Gilman SC. Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostate monoclonal antibody 7E11-C5. *Cancer Res*. 1990 Oct;50(19):6423-9.
149. Bargonetti J, Manfredi J. Multiple roles of the tumor supresor p53. *Curr Opin Oncol*. 2002 Jan;14(1):86-91 (Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Ann Rev Biochem*. 2008 Jul;77:557-82.
150. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. 1998 Sep;16(9):3158-68.
151. Xu LD, Muller S, Thoppe SR, Hellborg F, Kanter L, Lerner M, Zheng B, Lagercrantz SB, et al. Expression of the p53 target Wig-1 s associated with HPV status and patient survival in cervical carcinoma. *PLoS One*. 2014 Nov;9(11):e111125.
152. Stapleton AM, Timme TL, Gousse AE, Li QF, tobon AA, Kattan MW, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Primary human prostate cancer cells

- harboring p53 mutations are clonally expanded in metastasis. *Clin Cancer Res.* 1997 Aug;3(8):1389-97.
153. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, von Eschenbach AC, Conti CJ. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Oct;85(20):1657-69.
154. Che M, DeSilvio A, Pollack DJ, Grignon VM, Venkatesan GE, Hanks, et al. Prognostic value of abnormal p53 expression in locally advanced prostate cancer treated with androgen deprivation and radiotherapy: a study based on RTOG 9202. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Nov;69(4):1117-23.
155. Kudahetti SG, Fisher L, Ambroidine C, Foster V, Reuter J, Eastham, et al. p53 immunochemistry is an independent prognostic marker for outcome in conservatively treated prostate cancer. *BJU Int.* 2009 Jul;104(1):20-4
156. (Bykov VJ, Wilman KG. Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway. *Ann Med.* 2003;35(7):458-65.
157. Cowen D, Salem N, Ashoori F, Meyn R, Meistrich ML, Roth JA, Pollack A. Prostate cancer radiosensitization in vivo with adenovirus-mediated p53 gene therapy. *Clin Cancer Res.* 2000 Nov;6(11):4402-8.
158. Ritter MA, Gilchrist KW, Voytovich M, Chappell RJ, Verhoven BM. The role of p53 in radiation therapy outcomes for favorable-to-intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Jul;53(3):574-80.
159. Ejlersen B, Jensen M-B, Nielsen KV, Balslev E, Rasmussen BB, Willemoe GL, Hertel PB, Knoop AS, Mouridsen HT, Brünner N. HER2, TOP2A and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2010 Feb;28(6):984-90.
160. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Jun;101(25):9309-14.
161. Li X, Liu Y, Chen W, Fang Y, Xu H, Zhu HH, Chu M, Li W, Zhuang G, Gao WQ. TOP2A^{high} is the phenotype of recurrence and metastasis whereas TOP2A^{neg} cells represents cancer stem cells in prostate cancer. *Oncotarget.* 2014 Oct;5(19):9498-513.
162. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.

- Science. 1991 Mar;251(5000):1451-5 □ (Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg.* 2000 Aug;87(8):992-1005.
163. Behrens J. Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Acta Anat (Basel).* 1994;149(3):165-9.
164. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 1991;66(1):107-19. □
165. Kolijn K, Verhoef EI, van Leenders GJ. Morphological and immunohistochemical identification of epithelial-to-mesenchymal transition in clinical prostate cancer. *Oncotarget.* 2015 May 19.
166. Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* 1992 Sep;52(18):5104-9.
167. Nowel PC, Hungerford DA. DNA contents of chromosome Ph1 and Chromosome 21 in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1964 Jun;144(3623):1229-31.
168. Croce CM. Role of chromosome translocation in human neoplasia. *Cell* 1987 Apr;49(2):155-6.
169. Benz EJ. Anatomy and physiology of the gene. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology. Basic principles and practice.* New York: Churchill Livingstone, 1991:1-12.
170. Papavassiliou AG. Molecular Medicine. Transcription factors. *N Engl J Med.* 1995 Jan;332(1):45-7.
171. Rosenthal N. Regulation of gene expression. *N Engl J Med.* 1994 Oct;331(14):931-3.
172. Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD. The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood.* 1994 May;83(10):2780-6.
173. Le Beau MM, Larson RA. Cytogenetics and neoplasia. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology. Basic principles and practice.* New York: Churchill Livingstone, 1991:638-51.
174. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchida J, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS

- transcription factor genes in prostate cáncer. *Science*. 2005 Oct;310(57-48):644-8.
175. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, et al. ONCOMINE: A cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004 Jan-Feb;6(1):1-6.
176. Metzker ML: Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan; 11(1):31-46.
177. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keeffe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008 Aug;321(5891):956-60.
178. Hooper JD, Clements JA, Quigley JP, Antalis TM. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem*. 2001 Jan;276(2):857-60.
179. Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH, Antalis TM. Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Jun-Sep;22(2-3):237-58.
180. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
181. Vaarala MH, Porvari K, Kyllonen A, Lukkarinen O, Vihko P. The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cáncer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. *Int J Cancer*. 2001 Dec;94(5):705-10.
182. Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res*. 1999 Sep;59(17):4180-4.
183. Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res*. 2001 Feb;61(4):1686-92.
184. Balk SP, Knudsen KE. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal*. 2008 Feb;6:e001.
185. Camuzeaux B, Spriet C, Heliot L, Coll J, and Duterque-Coquillaud M. Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:1107-14.

186. Carver BS, Tran j, Chen Z, Carracedo-Perez A, Alimonti A, Nardella C, Gopalan A, Scardino PT, et al. ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*. 2009 Feb;457(7231):E1;discussionE2-3.
187. Randi AM, Sperone A, Dryden NH, Birdsey GM. Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors. *Biochem Soc Trans*. 2009 Dec;37(6):1248-53.
188. Oikawa T, Yamada T, Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*. 2003 Jan 16;303:11-34.
189. www.oncomine.org
190. Mark A. Rubin and Arul M. Chinaiyann. Bioinformatics approach leads to the discovery of the TMPRSS2:ETS gene fusion in prostate cancer. *Laboratory Investigation*. 2006;86:1099-1102.
191. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, Cao X, Wei JT, Rubin MA, Shah RB, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66:3396-400. □
192. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, Cao X, Singla N, Montie JE, Varambally S, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68:73–80.
193. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2009 Aug;6(8):429-39.
194. (Rickman DS, Plueger D, Moss B, VanDoren VE, Chen CX, de la Taille A, Kuefer R, et al. SLC45A3-ELK4 is a novel and frequent ETS fusion transcript in prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Apr;69(7):2734-8.
195. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, Bueti G, Shah RB, Gaston S, Tomlins SA, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul;15(14):4706-11.
196. Attard G, Clark J, Ambrosini L, et al. Heterogeneity and clinical significance of ETV1 translocations in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2008;99:314–20.
197. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, et al. Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 2007;20:538-44.
198. Teixeira MR. Chromosome mechanisms giving rise to the TMPRSS2- ERG fusion oncogene in prostate cancer and HGPIN lesions. *Am J Surg Pathol* 2008;32:642–4.

199. Yoshimoto M, Joshua AM, Chilton-MacNeill S, Bayani J, Selvarajah S, Evans AJ, Zielenska M, Squire A. 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.
200. 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;66:8347-51.
201. Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, et al. Diversity of TMPRSS-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*. 2007;26:2667-73.
202. Mosquera JM, Perner S, Demichelis F, Kim R, Hofer MD, Mertz KD, Paris PL, et al. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J Pathol*. 2007 May;212(1):91-101.
203. 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.
204. Nigwekar P, Müick S, Rittenhouse H, et al. Morphologic correlates of individual splice variants of TMPRSS2-ERG prostate cancer (PCa) detected by transcription-mediated amplification (TMA) in radical specimens. Abstract 797 USACAP 2008. Denver.
205. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 2006;8:826-32.
206. Furusato B, Gao CL, Ravindranath L, Chen Y, et al. Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multifocal prostate cancer. *Mod Pathol*. 2008;21(2):67-75.
207. Barry M, Perner D, Demichelis F, Rubin MA. TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications. *Urology*. 2007;70(4):630-33.
208. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:882-8.
209. Mosquera JM, Perner S, Genega EM, et al. Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 2008;14:3380-5.

210. Seth A and Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41:2462-2478.
211. Wang J, Cai Y, Ren C, Spencer DM, Ittmann M. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2-ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res*. 2008;68:8516-51.
212. Hart AH, Corrick CM, Tymms MJ, Hertzog PJ, and Kola. Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity. *Oncogene*. 1995;10:1423-30.
213. Schulz WA, Ingenwerth M, Djuidje CE, Hader C, Rahnenfuhrer J, Engers R. Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic deregulation. *BMC Cancer*. 2010 Sep;10:505.
214. Yang L, Mei Q, Zielinska-Kwiatkowska A, Matsui Y, Blackburn ML, Benedetti D, Krumm AA, Taborsky GJ Jr, and Chansky HA. An ERG (ets-related gene) associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J*. 2003;369:651-7.
215. Bjorkman M, Iljin K, Halonen P, Sara H, Kaivanto E, Nees M, Kallionemi OP. Defining molecular action of HDAC inhibitors synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer. *Int J Cancer*. 2008 dec;123(12)2774-81.
216. Terry S, Yang X, Cheng MW, Vacherot F, Buttyan R. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implications for prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2006 Oct;99(2):402-10.
217. Schweizer L, Rizzo CA, Spires TE, Platero JS, Wu Q, Lin TA, Gottardis MM, Attar RM. The androgen receptor can signal through Wnt/beta-catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. *BMC Cell Biol*. 2008 Jan;9:4.
218. Hawsworth D, Ravindranath L, Chen Y, Furusato B, et al. Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate*. 2010 May;70(7):745-54.
219. 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 Oct;8(10):826.32.
220. Schayek H, Haugk K, Sun S, True LD, Plymate SR, Werner H. Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls insulin-like growth factor I

- receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner. *Clin Can Res.* 2009 Mar;15(5):1558-65.
221. Carver BS, TRan J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo-Perz 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.
222. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature.* 2007;448:595-599.
223. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, et al. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(10):3584-90.
224. Clark J, Attard G, Jhavar S, et al. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 2008;27:1993–2003.
225. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate-cancers. *Cancer Cell.* 2008;13:519-28.
226. Jhavar S, Brewer D, Edwards S, et al. Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int.* 2009;103:1256-69.
227. Meiers I, Waters DJ, Bostwick DG. Preoperative prediction of multifocal prostate cancer and application of focal therapy:review 2007. *Urology.* 2007;70:3-8.
228. 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;67(17):7991-5.
229. Smit FP, Salagierski M, Jannik S, Schalken JA. High-resolution ERG-expression profiling on geneChip exon 1.0 ST arrays in primary and castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.* 2013 May;111(5):836-42.
230. 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 J Androl.* 2008; 10:467-73.
231. Laxman B, Tomlins S, Mehra R, Morris D, Wang L, Helgeson B et al. Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine in men with prostate cancer. *Neoplasia* 2006;8:885-888.
232. 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; 56:275-86.
233. Yao Y, Wang H, Li B, Tang Y. Evaluation of the TMPRSS2:ERG fusion for the detection of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2014 Mar;35(3):2157-66.
234. Hessels D, Smit F, Verhaegh G, Witjes J, Cornel E and Schalken J. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5103-8.
235. Roobol MJ, Zhu X, Schröder FH, van Leenders GJ, van Schalk RH, Bangma CH, Steyerberg EW. A calculator for prostate cancer risk 4 years after an initially negative screen: findings from ERSPC Rotterdam. *Eur Urol.* 2013 Apr;63(4):627-33.
236. Leyten G, Hessels D, Jannink S, Smit F, de Jong H, Cornel E, et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol.* 2014 Mar;65(3):534-42.
237. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, Bueti G, Siddiqui J, Tomlins SA, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol.* 2013 Jul;31(5):566-71.
238. 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;68(3):645-9.
239. Rajput AB, Miller MA, De Luca A, Boyd N, Leung S, Hurtado-Coll A, et al. Frequency of the TMPRSS2-ERG fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol.* 2007;60(11):1238-43.
240. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, Li C, Kaygusuz G, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol.* 2007;20:467-73.
241. Attard G, Clark J, Ambrosine 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;27(3):253-63
242. Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. Expression of the TMPRSS2:ERG gene fusion predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(12):1690-5.
243. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setur SR, et al.

- TMPRSS2:ERG gene fusion associated with letal prostate cáncer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*. 2007;26(31):4596-99.
244. Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cáncer with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3395-400.
245. Winnes M, Lissbrant E, Damber JE, Stenman G. Molecular genetic analyses of TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cáncer. *Oncol Rep*. 2007;17(5):1033-6.
246. 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;69(4):1400-6.
247. Toubaji A, et al. Increased gene copy number of ERG on chromosome 21 but not TMPRSS2-ERG fusion predicts outcome in prostatic adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2011;24(11):1511-20.
248. FitzGerald LM, Agalliu I, Johnson K, 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.
249. Perner S, Demicheli F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, et al. TMPRSS2:ERG fusion associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Can Res*. 2006;66(17):8337-41.
250. Tsuneyuki Oikawa ETS transcription factors: Possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95: 626–633.
251. Attard G, Reid AH, Yap TA, et al. Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J Clin Oncol*. 2008;26:4563-71)
252. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69:2912-8.
253. Attard G, Sarker D, Reid A, Molife R, Parker C, de Bono JS. Improving the outcome of patients with castration-resistance prostate cancer through rational drug development. *Br J Cancer*. 2006;95:767-74.
254. 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;66:10658-63.
255. Chen Y, Sawyers CL, Scher HI. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8:440-8.
256. Urbinati G, Muhammad A, Rousseau Q, Chapuis H, Desmaële D, Couvreur P, Massaad-Massade L. Antineoplastic effects of siRNA against TMPRSS2-ERG junction oncogene in prostate cancer. *PLoS One.* 2015 May;10(5):e0125277.
257. Silvestri I, Cattarino S, Aglianò AM, Collalti G, Sciarra A. Beyond the immune suppression: the immunotherapy in prostate cancer. *Biomed Res Int.* 2015 Jul;2015:794968.
258. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992;69:915-926.
259. Wolffe AP, Matkze MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999;286:481-6.
260. Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, star sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev.* 2012;13:484-92.
261. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome. Biological and translational implications. *Nat Rev.* 2011;11:726-34.
262. García-Giménez JL, Sanchís-Gomar F, Lippi G, Mena S, Ivars D, et al. Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2012 Oct;413(19-20):1576-82.
263. Sandoval J, Peiró-Chova L, Pallardó FV, García-Giménez JL. Epigenetics biomarkers in laboratory diagnosis: emerging approaches and opportunities. *Exp Rev Mol Diag.* 2013 Jun;13(5):547-71.
264. Dobosy JR, Roberts JL, Fu VX, Jarrard DF. The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hiperplasia. *J Urol.* 2007;177:822-31.
265. Ayree MJ, Liu W, Engelmann JC, Nuhn P, Gurel M, Haffner MC, et al. DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastasis. *Sci Transl Med.* 2013 Jan;5(169):169ra10.
266. Strand SH, Orntoft TF, Sorensen KD. Prognostic DNA methylation markers in prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15:16544-76.
267. Baden J, Adams S, Astacio T, Jones J, Markiewicz J, Painter J, Trust C, Wang Y, Green G. Predicting prostate biopsy result in men with prostate specific antigen 2.0 to 10.0 ng/ml using an investigational prostate cancer methylation assay. *J Urol.* 2011

- Nov;186(5):2101-6.
268. Wojno KJ, Costa FJ, Cornell RJ, Small JD, Pasin E, Van Crierkinge W, Bigley JW, Van Neste L. Reduced rate of repeated biopsies observed in ConfirmMDx clinical utility field study. *Am Health Drug Benefits*. 2014 May;7(3):129-34.
269. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Association of circulating tumor cells with tumor-related methylated DNA in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Int J Urol*. 2010 May;17(5):466-75.
270. Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, model F, Day JK, et al. DNA methylation biomarkers of prostate cancer: Confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive fluid for non-invasive detection. *Prostate*. 2009 Sep;69(12):1257-69.
271. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:2823-9.
272. Anglim PP, Galler JS, Koss MN, Hagen JA, Turla S, Campan M, et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2008;7:62.
273. Maier S, Nimmrich I, Koenig T, Eppenberguer-Castori S, Bohlmann I, Paradiso A, Spyrtos F, et al. DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node negative breast cancer patients. Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *PathoBiology group. Eur J Cancer*. 2007;43:1679-86.
274. Weiss G, Cottrell S, Distler J, Schatz P, Kristiansen G, Ittmann M, et al. DNA methylation of the pitx2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol*. 2009;181:1678-85.
275. Vanaja DK, Ehrich M, Van der Boom D, Cheville JC, Karnes RJ, Tindall DJ, Cantor CR, Young CY. Hypermethylation of genes for diagnosis and risk stratification of prostate cancer. *Cancer Invest*. 2009 Jun;27(5):549-60.
276. Dietrich D, Hasinger O, Bañez LL, Sun L, van Leenders GJ, Wheeler TM et al. Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *J Mol Diagnos*. 2013 Mar;15(2):279-9.
277. Vasiljevic N, Ahmad AS, Carter PD, Fisher G, Berney DM, Foster CS, Cuzick J,

- Lorincz AT. DNA methylation of PITX2 predicts poor survival in men with prostate cancer. *Biomark Med* 2014;8(9):1143-50.
278. Schayec H, Bentov I, Jacob-Hirsch J, Yeung C, Khanna C, Helman LJ, et al. Global methylation analysis identifies PITX2 as an upstream regulator of the androgen receptor and Igf-1 receptor genes in prostate cancer. *Horm Metab Res.* 2012;44:511-9.
279. Moyano Calvo JL, Blanco Palenciano E, Beato Moreno A, Gutiérrez González M, Pérez_lanzac Lorca A, Samaniego Torres A, Montañano JA, Fernández Castiñeiras J. Prognostic value of E-cadherina, beta-catenin, Ki-67 antigen and p53 protein in the superficial bladder tumors. *Actas Urol Esp.* 2006 Oct;30(9):871-8.
280. Ricciardi GR, Adamo B, Ieni A, Cardia R, Ferraro G, Franchina T, Tuccari G, Adamo V. Androgen Receptor (AR), E-cadherin, and ki-67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple-negative breast cancer (TNBC) patients. *PLoS One.* 2015 Jun;10(6):e01238368.
281. Instruction manual Applied Biosystems. RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit. Optimized for FFEP Samples. Part Number AM1975.
282. Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques.* 2010 Oct;49(4):iii-xi.
283. www.epidesigner.com/epidesigner/7851036750.html
284. Paulin,R., Grigg,G.W., Davey,M.W. and Piper,A.A. (1998) Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5⁰-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 26, 5009–5010.
285. Jemal A, Bray F, Venter MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
286. Kvale R, Moller B, Wahlqvist R, Fossà SD, Berner A, Busch C, Kyrдалen AE, Svindland A, Viset T, halvorsen OJ. Concordance between Gleason scores of needle biopsies and radical prostatectomy specimens: a population-based study. *BJU Int.* 2009 Jun;103(12):1647-54.
287. D'Elia C, Cerruto MA, Cioffi A, Novella G, Cavalleri S, Artibani W. Upgrading and upstaging in prostate cancer: from prostate biopsy to radical prostatectomy. *Mol Clin Oncol.* 2014 Nov;2(6):1145-9.
288. Melia J, Moseley R, Ball RY, Griffiths DF, Harnden P, Jarmulowicz M, McWilliam LJ, et al. A UK-based investigation of inter- and intra-observer reproducibility of Gleason grading of prostatic biopsies. *Histopathology.* 2006 May;48(6):644-54.

289. Mian BM, Lehr DJ, Moore CK, Fisher HA, Kaufman RP, Ross JS, Jennings TA, Nazeer T. Role of prostate biopsy schemes in accurate prediction of Gleason scores. *Urology*. 2006 Feb;67(2):379-83)
290. Lista F, Gimbernat H, Cáceres F, Rodríguez-Barbero JM, Castillo E, Angulo JC. Multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of extracapsular invasión and other staging parameters in patients with prostate cáncer candidates for radical prostatectomy. *Actas Urol Esp*. 2014 Jun;38(5):290-7.
291. Marcus DM, Rossi PJ, Nour SG, Jani AB. The impact of multiparametric pelvic magnetic resonance inaging on risk stratification in patients with localized prostate cáncer. *Urology*. 2014 Jul;84(1):132-7.
292. Gutierrez C, Terrasa F, Briones G, Conde G, Fuentes I, Hidalgo F, Bestard J, Rebassa M. Prognostic role of perineural invasión in prostatic biopsy. *Actas Urol Esp*. 2011 Jun;35(6):347-53.
293. Aumayr K, Breitegger M, Mazal PR, koller A, Marberger M, Susani M, Haitel A. Quantification of extraprostatic perineural spread and its prognostic value in pT3a pN0 M0 R0 prostate cancer patients. *Prostate*. 2011 Dec;71(16):1790-5)
294. Merrilees AD, Bethwaite PB, Russell GL, Robinson RG, Delahunt B. Parameters of perineural invasion in radical prostatectomy specimens lack prognostic significance. *Mod Pathol*. 2008 Sep;21(9):1095-100.
295. Reeves F, Hovens CM, Harewood L. Battye S, Petters JS, Costello AJ, Corcoran NM. Does perineural invasion in a radical prostatectomy specimen predict biochemical recurrence in men with prostate cancer?. *Can Urol Assoc J*. 2015 May;9(5-6):E252-5.
296. Gu YC, Yang CK, Kang HM, Chang KS, Wang J, Hung SW, Tung MC, Tewari AK, Patel VR. Pentafecta outcomes of 230 cases of robotic-assisted radical prostatectomy with bilateral neurovascular bundle preservation. *Anticancer Res*. 2015 Sep;35(9):5007-13
297. Chaifin HJ, Dinizo M, Trock BJ, Feng Z, Partin AW, Walsh PC, Humphreys E, Han M. Impact of surgical amrgin status on prostate-cancer-specific mortality. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11):1684-9
298. Yossepowitch O, Briganti A, Eastham JA, Epstein J, Graefen M, Montironi R, Touijer K. Positive surgical margins after radical prostatectomy: a systematic review and contemporary update. *Eur Urol*. 2014 Feb;65(2):303-13.
299. Ward JF, Zincke H, Bergstralh EJ, Slezak JM, Myers RP, Blute ML. The impact of

- surgical approach (nerve bundle preservation versus wide local excision) on surgical margins and biochemical recurrence following radical prostatectomy. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1328-32.
300. Novara G, Ficarra V, Mocellin S, Ahlering TE, Carroll PR, Graefen M, Guazzoni G, Menon M, Patel VR, Shariat SF, Tewaki AK, Van Poppel H, Zattoni F, Montorsi F, Mottrie A, Rosen RC, Wilson TG. Systematic review and meta-analysis reporting oncologic outcomes after robot assisted radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2012 Sep;62(3):382-404.
301. Bolla M. Combination of radiotherapy and hormonotherapy in locally advanced cancers of the prostate. *Cancer Radiother.* 1997;1(5):439-42.
302. Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE. Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? *J Urol.* 2002 Aug;168(2):514-18.
303. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Humphrey PA, Mikuz G, Newling D, Nilsson S, Sakr W, Srigley JR, Wheeler TM, Montitroni R. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005 May;(216):34-63.
304. Jaraj SJ, Camparo P, Boyle H, Germain F, Nilsson B, Petersson F, Egevad L. Intra and interobserver reproducibility of interpretation of immunohistochemical stains of prostate cancer. *Virchows Arch.* 2009 Oct;455(4):375-81.
305. Rubin MA, Zerkowski MP, Camp RL, Kuefer R, Hofer MD, Chinnaiyan AM, Rimm DL. Quantitative determination of expression of the prostate cancer protein alpha-methylacyl-CoA racemase using automated quantitative analysis (AQUA): a novel paradigm for automated and continuous biomarker measurements. *Am J Pathol.* 2004 Mar;164(3):831-40.
306. Faratian D, Kay C, Robson T, Campbell FM, Grant M, Rea D, Bartlett JM. Automated image analysis for high-throughput quantitative detection of ER and PR expression levels in large-scale clinical studies: the TEAM Trial Experience. *Histopathology.* 2009 Nov;55(5):587-93.
307. Young CY, Montgomery BT, Andres PE, Qui SD, Bilhartz DL, Tindall DJ. Hormonal regulation of prostate-specific antigen Messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.* 1991 Jul;51(14):3748-52.
308. Montgomery BT, Young CY, Bilhartz DL, Andrews PE, Prescott JL, Thompson NF, Tindall DJ. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein

- in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*. 1992;21(1):63-73.
309. Trapman J, Cleutjens KB. Androgen-regulated gene expression in prostate cancer. *Semin Cancer Biol*. 1997 Feb;8(1):29-36.
310. Gurova KV, Roklin OW, Krivokrysenko VI, Chumakov PM, Cohen MB, Feinstein E, Gudkov AV. Expression of prostate specific antigen (PSA) is negatively regulated by p53. *Oncogene*. 2002;21:153-7.
311. Aihara M, Lebovitz RM, Wheeler TM, Kinner BM, Ohori M, Scardino PT. Prostate specific antigen and Gleason grade: an immunohistochemical study of prostate cancer. *J Urol*. 1994 Jul;151(6):1558-64.
312. Weir EG, Partin AW, Epstein JI. Correlation of serum prostatic antigen and quantitative immunohistochemistry. *J Urol*. 2000 Jun;163(6):1739-42.
313. Augustin H, Hammerer PG, Graefen M, Palisaar J, Daghofner F, Huland H, Erbersdobler A. Characterization of biomolecular profiles in primary high-grade prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Nov;129(11):662-8.
314. Erbersdobler A, Isbarn H, Steiner I, Schlomm T, Chun F, Mirchaler M, Sauter G. Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology*. 2009 Nov;74(5):1169-73.
315. Sauvageot J, Epstein JI. Immunoreactivity for prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in adenocarcinoma of the prostate: relation to progression following radical prostatectomy. *Prostate*. 1998;34:29-33.
316. Chuang TD, Chen SJ, Lin FF, Veeramani S, Kumar S, Batra SK, Lin MF. Human prostatic acid phosphatase, an authentic tyrosine phosphatase, dephosphorylates Erb-2 and regulates prostate cancer cell growth. *J Biol Chem*. 2010 Jul;280(31):23598-606.
317. Veeramani S, Lee MS, Lin FM. Revisiting histidine-dependent acid phosphatases: a distinct group of tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci*. 2009 Jun;34(6):273-8.
318. Hammond ME, Sause WT, Martz KL, Pilepich MV, Asbell SO, Rubin P, Myers RP, Farrow GM. Correlation prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen immunocytochemistry with survival in prostate carcinoma. *Cancer* 1989 Feb;63(3):461-6.
319. Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB. Significance of increased phosphatase activity at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am J Cancer*. 1936;28:485-95.

320. Kirschenbaum A, Lui XH, Yao S, Leiter A, Levine AC. Prostatic acid phosphatase is expressed in human prostate cancer bone metastases and promotes osteoblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Nov;1237:64-70.
321. Larson SR, Chin J, Zhang X, Brown LG, Coleman IM, Lakely B, Tenniswood M, Corey E, Nelson PS, Vessella RL, Morrissey C. Prostate cancer derived prostatic acid phosphatase promotes an osteoblastic response in the bone microenvironment. *Clin Exp Metastasis.* 2014 Feb;31(2):247-56.
322. Igawa T, Lin FF, Rao P, Lin MF. Suppression of LNCaP prostate cancer xenograft tumors by a prostate-specific protein tyrosine phosphatase, prostatic acid phosphatase. *Prostate.* 2003 Jun;55(4):247-58.
323. Veeramani S, Yuan TC, Lin FF, Petersen JE, Shaheduzzaman S, Srivastava S, MacDonald RG, Lin MF. Cellular prostatic acid phosphatase: A protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr relat Cancer.* 2005 Dec;12(4):805-22.
324. Vihko PT, Quintero I, Ronka AE, Herrala A, JAntti P, Porvari K, Lindqvist Y, Kaija H, Pulkka A, Vuoristo J, et al. Prostatic acid phosphatase (PACP) is PI(3)P-phosphatase and its activation leads to change of cell polarity and invasive prostate cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2005;46:5239.
325. Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3463-8) (Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2002 Dec;187(1-2):1-7.
326. Sweat SD, Pacelli A, Bergstralh EJ, Slezak JM, Cheng L, Bostwick DG. Androgen receptor expression in prostate cancer lymph node metastases is predictive of outcome after surgery. *J Urol.* 1999 Apr;161(4):1233-7.
327. Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC, Delprado W, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL. Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan;61(12):423-7.
328. Ruizeveld de Winter JA, Janssen PJ, Sleddens HM, Verleun-Mooijman MC, Trapman J, Brinkmann AO, Santerse AB, Schröder FH, van der Kwast TH. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol.* 1994 Apr;144(4):735-46.
329. Bánfi G, Teleki I, Keszthelyi A, Fintha A, Krenács T, Szende B. Changes of

- protein expression in prostate cancer having lost its androgen sensitivity. *Int Urol Nephrol*. 2015 Jul;47(7):1149-54.
330. Zegarra-Moro O, Schmidt LJ, Huang H, Tindall DJ. Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation and androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002 Feb;62(4):1008-13.
331. Newmark JR, Hardy D, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Jul;89(14):6319-23.
332. Krupski T, Petroni GR, Frierson HF Jr, Theodorescu JU. Microvessel density, p53, retinoblastoma and chromogranin A immunohistochemistry as predictors of disease-specific survival following radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Urology*. 2000 May;55(5):7743-9.
333. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 1996 Oct;156(4):1511-6.
334. Osman I, Drobnjak M, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact in tumor progression. *Clin Cancer Res*. 1999 Aug;5(8):2082-8.
335. Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF Jr. p53, bcl-2 and retinoblastoma proteins as long-term prognostic markers in localized carcinoma of the prostate. *J Urol*. 1997 Jul;158(1):131-7.
336. Moul JW. Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol*. 1999;35(5-6):399-407.
337. Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF, Moriarty R. Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology*. 1996 Aug;48(2):326-34.
338. Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology*. 1998 Oct;52(4):637-40.
339. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and

- progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(25):9309-14.
340. Li X, Liu Y, Chen W, Fang Y, Xu H, Zhu HH, Chu M, Li W, Zhuang G, Gao WQ. TOP2A^{high} is the phenotype of recurrence and metastasis whereas TOP2A^{neg} cells represent cancer stem cells in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 Oct;5(19):9498-513.
341. Murant SJ, Handley J, Stower M, Reid N, Cussenot O, Maitland NJ. Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 1997 Feb;33(2):263-71.
342. Giroldi LA, Schalken JA. Decreased expression of the intracellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. *Cancer metastasis Rev*. 1993 Mar;12(1):29-37.
343. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HF, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*. 1994 Jul;54(14):3929-33.
344. Kuczyk M, Serth J, Machtens S, Bokemeyer C, Bathke W, Stief C, Jonas U. Expression of E-cadherin in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Br J Urol*. 1998 Mar;81(3):406-12.
345. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Kench JG, Golovsky D, Brenner PC, O'Neil GF, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL. Lower levels of nuclear beta-catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int J Cancer*. 2005 Jan;113(3):415-22.
346. Suryavanshi M, eahta A, Jaipuria J, Sharma AK, Rawal S, Seth N. Weaker ERG expression in patients with ERG-positive prostate cancer is associated with advanced disease and weaker androgen receptor expression: An indian Outlook. *Urol Oncol*. 2015 Jul;33(7):331.
347. Hoogland AM, Jenster G, van Weerden WM, Trapman J, van der Kwast T, Roobol MJ, Schröder FH, Wildhagen MF, van Leenders GJ. 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.
348. Nishijima J, Hara T, Ikemoto K, Oga A, Kobayashi K, Kawai Y, Matsumoto H, Nagao K, Sasaki K, Gkoleizakis V, Fichtner J, Matsuyama H. Clinical significance of ERG rearrangement subtype and its association with increased p53 expression in Japanese and German prostate cancer. *Neoplasma*. 2015 Jan;62(2):278-87.

349. Hägglöf C, Hammarsten P, Strömvall K, Egevad L, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, Bergh A. TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *PLoS One*. 2014 Feb;9(2):e86824.
350. He J, Schepmoes AA, Shi T, Chaochao W, Fillmore TL, Gao Y, Smith RD, Qian WJ, Rodland KD, et al. Analytical platform evaluation for quantification of ERG in prostate cancer using protein and mRNA detection methods. *J Trans Med*. 2015 Feb;13:54.
351. He J, Sun X, Shi T, Schepmoes AA, Fillmore TL, Petyuk VA, Xie F, Zhao R, Gritsenko MA, et al. Antibody-independent targeted quantification of TMPRSS2-ERG fusion protein products in prostate cancer. *Mol Oncol*. 2014 Oct;8(7):1169-80.
352. Szász AM, Majoros A, Rosen P, Srivastava S, Dobi A, Szendrői A, Kulka J, Nyirády P. Prognostic potential of ERG (ETS-related gene) expression in prostatic adenocarcinoma. *Int Urol Nephrol*. 2013 Jun;45(3):727-33.
353. Font-Tello A, Juanpere N, de Muga S, Lorenzo M, Lorente JA, Fumador L, Serrano L, Serrano S, Lloreta J, Hernández S. Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *Prostate*. 2015 Aug;75(11):1216-26.
354. Berg KD, Vainer B, Thomsen FB, Roder MA, Gerds TA, Toft BG, Braso K, Iversen P. ERG protein expression in diagnostic specimens is associated with increased risk of progression during active surveillance for prostate cancer. *Eur Urol*. 2014 Nov;66(5):851-60.
355. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, Stack EC, Martin NE, Kunz L, Penney KL, Ligon AH, Suppan C, Flavin R, Sesso HD, Rider JR et al. The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Sep;21(9):1497-509.
356. Xu B, Chevarie-Davis M, Scarlata E, Ziezafoun N, Dragomir A, Tanguay S, Kassouf W, Aprikian A, Brimo F. The prognostic role of ERG immunopositivity in prostatic acinar adenocarcinoma: a study including 454 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2014 Mar;45(3):488-97.
357. 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. *J Urol*. 2010 May; 183(5):2054-61.

358. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, Palanisamy N, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Shah RB. 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.
359. Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Mick S, Williamsen S, Hodge P, Meinke J, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated PSA. *Sci Transl Med*. 2011 Aug;3(94):94ra72.
360. Eguchi CF, Faria EF, Scapulatempo Neto C, Longatto-Filho A, Zanardo-Oliveira C, Taboga SR, Campos SG. The role of TMPRSS2:ERG in molecular stratification of PCa and its association with tumor aggressiveness: a study in Brazilian patients. *Sci Rep*. 2014 Jul;4:5640.
361. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, Cao Q, Presner JR, Rubin MA, Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM. Role of TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. 2008 Feb;10(2):177-88.
362. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*. 2007 Jan(1);39:41-51.
363. Fine SW, Gopalan A, Leversha MA, Al-Ahmadie HA, Tickoo SK, Zhou Q, Satagopan JM, Scardino PT, Gerald WL, Reuter VE. TMPRSS2-ERG gene fusion is associated with low Gleason scores and not with high-grade morphological features. *Mod Pathol*. 2010 Oct;23(10):1325-33.
364. Yang M, Park JY. DNA methylation in promoter region as biomarkers in prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2012;863:67-109) (Park JY. Promoter hypermethylation as a biomarker in prostate adenocarcinoma. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:607-25.
365. Li LC. Epigenetics of prostate cancer. *Front Biosci*. 2007;12:3377-97.
366. Vela I, Morrissey C, Zhang X, Chen S, Corey E, Strutton GM, Nelson CC, Nicol DL, Clements JA, Gardiner EM. PITX2 and non-canonical Wnt pathway interaction in metastatic prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2014 Feb;31(2):199-211.
367. Vinarskaja A, Schulz WA, Ingenwerth M, Hader C, Arsov C. Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis. *Urol Oncol*. 2013 Jul;31(5):622-7.

368. Litovkin K, Joniau S, Lerut E, Laenen A, Gevaert O, Spahn M, Kneitz B, Isebaert S, Haustermans K, Beullens M, Van Eynde A, Bollen M. Methylation of PITX2, HOXD3, RASSF1 and TDRD1 predicts biochemical recurrence in high-risk prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Nov;140(11):1849-61.
369. Bañez LL, Sun L, Van Leenders GJ, Wheeler TM, Bangma CH, Freedland SJ, Ittmann MM, Lark AL, Madden JF, Hartman A, Weiss G, Castaños-Vélez E. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol*. 2010 Jul;184(1):149-56.
370. Kron K, Liu L, Truel D, Perthe V, Trachtenberg J, Fleshner N, Bapat B, van der Kwast T. Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 May;18(10):2896-904.

ANEXO

ANEXO 1: CRITERIOS RECIST

Los criterios RECIST 1.1. (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) son una herramienta útil que permite una valoración objetiva de la respuesta al tratamiento, disminuye la variabilidad interobservador y unifica los criterios para la decisiones terapéuticas.

Desde 1979 en que se detallan los primeros criterios de respuesta publicados por la OMS hasta el actual RECIST versión 1.1 publicados en el año 2009 muchas han sido las publicaciones y trabajos de investigación que se han apoyado en ellos para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. Por ello conviene saber manejar para valorar resultados de las nuevas terapias que tenemos a nuestro alcance en esta patología.

Criterios de valoración:

- Lesión órgano medible: Debe medir más de 10 mm en su diámetro mayor.
- Lesión órgano no medible: se incluyen las de <10 mm, tanto medibles como no medibles.
- Las metástasis óseas con componente de partes blandas tienen la misma consideración dependiendo del tamaño de la lesión.
- Adenopatía medible: Adenopatía 15 mm en su eje corto.
- Adenopatía no medible: 10-15 mm.
- Adenopatía no valorable: < 10 mm.
- Lesiones diana: son las lesiones que elegimos, medibles, hasta un máximo de 5 y no más de 2 en un mismo órgano, para evaluar la evolución de la enfermedad. La suma de los diámetros de todas las lesiones dianas, diámetro mayor en las de órgano y menor en las adenopatías, deber ser calculada en el estudio basal, para posteriormente ser valorada objetivamente en el seguimiento. Las lesiones no diana no tienen que ser medidas pero sí documentadas en el estudio basal.

Criterios de respuesta:

Lesiones diana en órgano

- Respuesta completa: desaparición de todas las lesiones que en el caso de las adenopatías deben haber disminuido por debajo de 10 mm.

- Respuesta parcial: al menos una reducción del 30% de la suma de todos los diámetros.
- Progresión: al menos un incremento del 20% de la suma de todos los diámetros del estudio previo y al menos un incremento de 5 mm como valor absoluto.
- Enfermedad estable: si la reducción es menor al 30% o la progresión menor del 20% ó menor de 5 mm en la suma de los diámetros.
- Lesiones diana en adenopatías. En este caso lo único que varía es la respuesta completa o estabilización ya que como se consideran no patológicas las < 10 mm, la suma de los diámetros puede no ser 0.

Lesiones no diana.

- Respuesta completa: desaparición de la totalidad de las lesiones.
- No remisión completa/no progresión: persistencia de una o más lesiones y/o niveles de marcador bioquímico elevados.
- Progresión: aumento de la carga tumoral de magnitud importante o aparición de nuevas lesiones

ANEXO 2: TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La técnica de electroforesis en gel se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Esta técnica consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso. La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. El ADN lo localizamos en el gel tiñendo con Redsafe (ChemBio), que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante.

Objetivo

Verificar el producto de la PCR para la amplificación de la fusión TMPRSS2/ERG exón4.

Receta para preparar gel de agarosa

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, siendo la concentración mínima el 0,7% (fragmentos grandes de varias Kpb) y la máxima el 4% (fragmentos de 50-150 pb).

Procedimiento

1. Preparar la bandeja de electroforesis primero y luego el gel. Las bandejas que se usan vienen con unos extremos que tienen “lados” que pueden acercarse para tapar esa sección y evitar que se pierda el gel. De no tener ese tipo de bandeja, hay que tapar los extremos con cinta adhesiva.
2. Colocar los peines en la bandeja de electroforesis. La bandeja tiene unas “guías” que indican donde colocarlos. De no ser así, coloque el peine a 1 cm del borde. Los productos de PCR se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v en 100 mL tampón TBE 0,5 X y se tiñen con Redsafe (ChemBio).
3. Mezclar 2 g de agarosa con 100 mL de TBE 0.5X en un frasco Erlenmeyer limpio y calentar en un microondas (Figura 44). Usar guantes resistentes al calor.

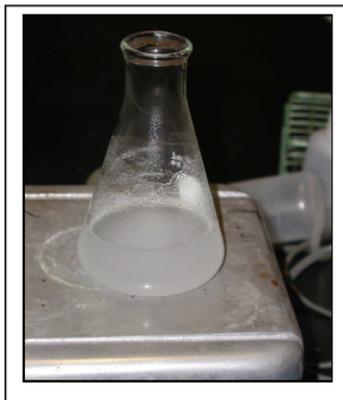


Figura 44: Calentamiento de la mezcla de agarosa con el amortiguador (TBE 0,5X)

4. Agitar girando la mezcla de vez en cuando.

5. Cuando empiece a burbujear, y aclare, agitar constantemente hasta que hierva y se vean burbujas en la superficie.
6. Asegurar que toda la agarosa se ha disuelto.
7. Remover del microondas y dejar enfriar hasta que se pueda coger sin quemar.
8. Añadir 8 μ l de Redsafe para teñir el gel
9. Verter la mezcla en la bandeja de electroforesis empezando en una esquina (Figura 45), y romper las burbujas.
10. Dejar que se solidifique el gel y colocar la bandeja en un lugar seguro para que no se contamine.

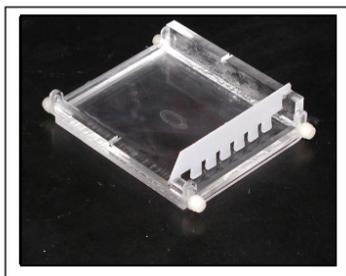


Figura 45: a) colocación de peine en la bandeja, b) vertido cuidadoso de la mezcla en la bandeja, c) esperar hasta tornarse opaco y sólido.

Para preparar TBE 0,5X

Si se usa TBE 10X:

- En una probeta vierta 100 ml de TBE 10X y añada agua destilada hasta llegar a 2 L.

Electroforesis

Procedimiento

1. Se quita la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis. ¡¡OJO!!: Los pocillos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
2. Se aplican 4 μ l del tampón de carga en un trozo de parafilm y se mezclan con 10 μ l de la muestra preparada. Nota 1: Mezclar la muestra con el tampón de carga, el volumen de muestra depende del tamaño de peine con el que se han hecho los pocillos en el gel de agarosa,

normalmente es de 10-30 μl . De tampón de carga se añade 1/3 del volumen de muestra. Nota 2: El tinte (loading buffer) que se utiliza contiene bromofenol azul y glicerol. El bromofenol azul es un colorante que se usa para observar el avance el ADN, y el glicerol le da peso a la muestra evitando así que ésta se salga del pocillo.

3. Se añade tampón de electroforesis TBE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
4. Utilizando una micropipeta, cuidadosamente se aplican 8 μl de marcador de pesos moleculares en el primer pocillo. Para las demás muestras, coloque 10 μL en los pocillos siguientes.
5. Se sugiere colocar un papel oscuro debajo de la cubeta antes de cargar las muestras. Esto le ayudará a ver mejor dónde se encuentran los pocillos.
6. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se comprueba que está bien conectada.
7. Se programa la fuente a unos 120 voltios y se comienza a correr la electroforesis que durará unos 30-45 minutos (Figura 46).

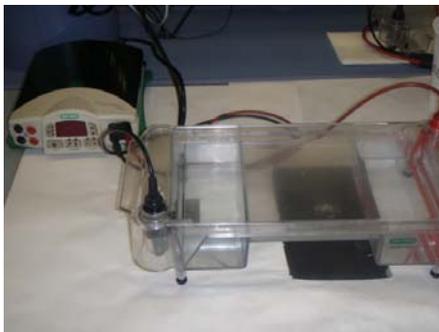


Figura 46: Aparato de electroforesis y fuente de energía.

8. Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV y se realiza una fotografía de la imagen (Figura 47).



Figura 47: Transiluminador