

UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Mecanismos estromales de la  
progresión tumoral en cultivos  
celulares de fibroblastos procedentes  
de pacientes con cáncer de próstata**

TESIS DOCTORAL  
**Beatriz Lobo Rodríguez**

UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Mecanismos estromales de la  
progresión tumoral en cultivos  
celulares de fibroblastos procedentes  
de pacientes con cáncer de próstata**

TESIS DOCTORAL  
**Beatriz Lobo Rodríguez**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
<b>"MECANISMOS ESTROMALES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CULTIVOS CELULARES DE FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA"</b>	<b>"STROMAL MECHANISM OF TUMOR PROGRESSION IN CELL CULTURES OF FIBROBLASTS FROM PATIENTS WITH PROSTATE CANCER"</b>
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: <b>BEATRIZ LOBO RODRÍGUEZ</b>	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: <b>CIENCIAS DE LA SALUD</b>	
Órgano responsable: <b>COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO</b>	

### RESUMEN (en español)

#### INTRODUCCIÓN

Dada su incidencia y prevalencia, el cáncer de próstata representa un importante problema de salud. Dado que los carcinomas derivan del compartimento epitelial, la mayoría de las investigaciones se han focalizado en el epitelio maligno, sin embargo, en los últimos años se está dando mayor importancia al microambiente tumoral y al estroma prostático. Las interacciones entre epitelio y estroma implican a muchos factores y hormonas, además del receptor androgénico. Cada vez está más claro que el compartimento estromal es importante en la invasión y progresión del cáncer, pudiendo ser una fuente de nuevos biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas. El objetivo de este trabajo se basó en el estudio de determinados factores en el estroma prostático en el cáncer de próstata con el fin de encontrar posibles marcadores diagnósticos y dianas terapéuticas.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Planteamos un estudio prospectivo de las muestras prostáticas de pacientes con cáncer de próstata. Se analizaron muestras de los diferentes grupos pronósticos dentro de los tumores localizados, así como muestras de pacientes metastásicos sin haber iniciado tratamiento de privación androgénica. Se compararon los resultados con los de las muestras no tumorales alejadas del tumor (control sano). Tras obtener las muestras mediante biopsia transrectal de próstata, se enviaron al laboratorio para cultivo celular de fibroblastos. Una vez aislados los fibroblastos, se evaluó en ellos la expresión de 10 factores derivados del estroma entre los que se incluyeron el receptor androgénico (**RA**), factores de crecimiento (**FGF-2**, **FGF-7**, **FGF-10**, **HGF**, **TGF- $\beta$**  y **PDGF-B**), y proteínas implicadas en la invasión (**MMP-2**, **MMP-9** y **MMP-11**). Realizamos estudios estadísticos para evaluar las diferencias de expresión de estos por los distintos grupos.

#### RESULTADOS

Se analizaron 45 muestras de un total de 30 pacientes con tumores de próstata sometidos a biopsia transrectal. De ellos, 6 fueron metastásicos y 24 pacientes tenían tumores localizados. Además, en 15 casos se recogieron muestras de tejido normal, todos ellos procedentes del tejido no neoplásico lejano al tumor de pacientes con neoplasias localizadas. Se objetivó que, a mayor estadio tumoral, mayor expresión de **MMP-11** e,



inversamente, ocurre con **TGF- $\beta$ 1**. A mayor Gleason se produce una disminución de la expresión de los factores **MMP-2** y **TGF- $\beta$ 1**. Se observaron aumentadas las expresiones de **FGF-7**, **MMP-2** y **MMP-11** respecto al tejido prostático no tumoral y disminuyeron su expresión respecto al tejido normal **FGF-10** y **MMP-9**. En el estudio univariable se demostró que una mayor expresión de **FGF-10** en los fibroblastos se asociaba estadísticamente con menor tiempo libre de enfermedad. En el análisis de regresión de Cox incluyendo **FGF-10** y los parámetros clínicos de la biopsia de próstata como fueron el **PSA**, estadio y el grado de la biopsia, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Del mismo modo **FGF-10** tampoco resultó un factor clínico predictor de recidiva al incluir datos de la prostatectomía radical como fueron el grado y estadio de la pieza y la presencia de márgenes afectos.

### CONCLUSIONES

De estos resultados se deduce que la falta de correlación entre el PSA y la sobreexpresión de los marcadores estudiados indicaría que la carcinogénesis en el estroma es independiente de los andrógenos. En tumores de próstata localizado a mayor estadio tumoral se observa una mayor expresión de **MMP-11** y una disminución de la expresión de **TGF- $\beta$ 1**. Una suma de Gleason más alta en la pieza de prostatectomía radical se asoció significativamente con una disminución de las expresiones de **MMP-2** y de **TGF- $\beta$ 1**. En pacientes con tumores localizados y tumores metastásicos, se observaron aumentadas las expresiones de **FGF-7**, **MMP-2** y **MMP-11**, respecto al tejido prostático no tumoral. Por el contrario, disminuyeron su expresión respecto al tejido normal **FGF-10** y **MMP-9**. **FGF-10** estromal resultó ser el único factor clínico predictor de recidiva bioquímica.

### RESUMEN (en Inglés)

#### INTRODUCTION

Prostate cancer represents a health problem due to its incidence and prevalence. Since carcinomas derive from the epithelial compartment, most research has focused on the malignant epithelium, however, in recent years greater importance is being given to the tumour microenvironment and the prostatic stroma. It is increasingly clear that the stromal compartment is important in cancer invasion and progression and may be a source of new biomarkers and potential therapeutic targets. The aim of this work was based precisely on the study of certain prostate stromal factors in prostate cancer in order to find possible diagnostic markers, prognostic and therapeutic targets

#### MATERIAL AND METHODS

A prospective study is performed to analyze prostate samples from patients with prostate cancer. Specimens were collected from the different prognostic groups within the localized tumors, as well as samples from metastatic patients without having started androgen deprivation treatment. The results were compared with those of nontumor samples away from the tumor (control). After obtaining the specimens by transrectal prostate biopsy, they were sent to the laboratory to cultivate and isolate the fibroblasts in which we performed analyses of different molecular markers with the intention of comparing their value in the different groups of patients. Once the fibroblasts were isolated, they were assessed for expression of 10 stromal-derived factors including androgen receptor (**AR**), growth factors (**FGF-2**, **FGF7**, **FGF10**, **HGF**, **TGF- $\beta$**  and **PDGF-B**), and proteins involved in invasion (**MMP-2**, **MMP-9** and **MMP-11**). The follow-up was carried out at the Urology consultation according to the protocols



corresponding to the European guides. We conducted statistical studies to evaluate the differences in expression according to tumor grade, stage, localized or metastatic, comparing them with normal tissue, we also analyzed if there are correlations between the expression of markers, and finally, the relationship with time-free survival.

### **RESULTS**

We analyzed 45 specimens from 30 patients with CaP who underwent transrectal biopsy. From 30 cases, 24 tumors were localized and 6 metastatic. From patients with localized tumors, 15 specimens were taken away from the tumor, in peripheral areas, as a normal tissue control group. It was observed that the higher the tumor stage, the higher the expression of **MMP-11** and, inversely, **TGF- $\beta$ 1**. The higher the Gleason, the lower the expression of **MMP-2** and **TGF- $\beta$ 1**. **FGF-7**, **MMP-2** and **MMP-11** expression was increased in non-neoplastic prostate tissue and decreased in normal tissue with respect to **FGF-10** and **MMP-9**. The univariate study showed that higher **FGF-10** expression in fibroblasts was statistically associated with shorter disease-free time. Cox regression analysis including **FGF-10** and prostate biopsy clinical parameters such as PSA, stage and biopsy grade did not show statistically significant results. **FGF-10** was not a clinical predictor of recurrence when including data from the radical prostatectomy such as the grade and stage of the biopsy and the presence of affected margins.

### **CONCLUSIONS**

Therefore, our findings led us to consider that the absence of correlation between **PSA** and overexpression of the studied markers would indicate that carcinogenesis in the stroma is independent of androgens. In localized prostate tumors at higher tumor stages, increased expression of **MMP-11** and decreased expression of **TGF $\beta$ -1** are observed. A higher Gleason sum in the radical prostatectomy specimen was significantly associated with decreased **MMP-2** and **TGF $\beta$ -1** expression. In patients with localized tumors and metastatic tumors, increased expressions of **FGF-7**, **MMP-2** and **MMP-11** were observed, relative to non-tumor prostate tissue. In contrast, **FGF-10** and **MMP-9** expression was decreased compared to normal tissue. Stromal **FGF-10** was the only clinical predictor of biochemical recurrence.

## *Agradecimientos*

Dar las gracias a todas las personas que me han acompañado en este camino.

En primer lugar, a mis directores de tesis. El Dr. **Jesús M. Fernández** por la oportunidad de realizar este trabajo, su paciencia en las “largas esperas”, su ayuda, su preocupación y sobre todo gracias por confiar en mí. Al Dr. **Safwan Escaf**, gracias por el apoyo, siendo consciente de lo difícil de estar trabajando en todas nuestras tesis, agradecer todas las enseñanzas recibidas, y desearte una feliz jubilación.

A todo el laboratorio del Hospital de Jove, y en especial a la **Dra. Noemí Eiró** por la realización de los cultivos celulares y fomentar su vocación investigadora.

Gracias a mis padres, **Lydia y Juan**, por todo el esfuerzo que habéis dedicado por mí durante toda mi vida.

Gracias a **Ana y Amor**, por todos los buenos y malos ratos en el trabajo, por servirme de apoyo y ánimo.

A mi amigo y compañero, **Diego Castanedo**, por el “impulso” que me ayudó a sentir que todo es posible.

A **Adán**, por sus minuciosas correcciones y transmitirme total tranquilidad.

Y finalmente gracias a ti, **Jorge Suárez**, por tu amistad desde hace más de veinte años que traspasa lo profesional. Por aguantarme, por ayudarme, por compartir conmigo tus enseñanzas de vida y por, en definitiva, marcar mi existencia. Gracias por estar siempre y sin miramientos a mi lado y compartir todo lo mío con la misma intensidad como si fuese tuyo

# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	I
<b>Índice Tablas</b> .....	IV
<b>Índice de Figuras</b> .....	V
<b>Abreviaturas</b> .....	VI
<b>1.Introducción</b> .....	1
1.1 Definición del problema.....	3
1.1.1 Epidemiología.....	3
1.1.2 Etiopatogenia y factores de riesgo.....	5
1.1.3 Patología de las neoplasias prostáticas.....	8
1.1.4 Sistemas de clasificación.....	9
1.1.5 Cribado y Diagnóstico.....	11
1.1.6 Tratamiento del cáncer de próstata.....	18
1.1.7 Valoración del pronóstico del cáncer de próstata.....	20
1.2 Cáncer de próstata y estroma reactivo.....	22
1.3 Cultivos de células prostáticas.....	26
1.4 Receptor androgénico.....	29
1.5 Factores de crecimiento en el cáncer de próstata.....	34
1.5.1 Familia de los factores de crecimiento de fibroblastos.....	35
1.5.1.1 Factor de crecimiento de fibroblastos 2 .....	39
1.5.1.2 Factor de crecimiento de fibroblastos 7 .....	42
1.5.1.3 Factor de crecimiento de fibroblastos 10.....	45
1.5.2 Factor de crecimiento transformante $\beta_1$ .....	51
1.5.3 Factor de crecimiento de hepatocitos .....	58
1.5.4 Factores de crecimiento derivado de plaquetas B .....	62
1.6 Metaloproteinasas.....	68
1.6.1 Metaloproteinasas 2 .....	70
1.6.2 Metaloproteinasas 9 .....	71
1.6.3 Metaloproteinasas 11 .....	75

<b>2. Hipótesis</b> .....	77
<b>3. Objetivos</b> .....	82
<b>4. Material y métodos</b> .....	85
4.1 Diseño del estudio.....	87
4.1.1 Población de estudio.....	87
4.1.2 Métodos de obtención de muestras.....	88
4.1.3 Selección de las muestras válidas para el estudio.....	89
4.1.4 Obtención de los datos clínicos.....	89
4.2 Técnica del cultivo de fibroblastos.....	90
4.2.1 Determinaciones moleculares.....	91
4.2.2 Aspectos éticos y de confidencialidad.....	92
4.2.3 Estudio estadístico.....	93
<b>5. Resultados</b> .....	94
5.1 Características de la Serie.....	96
5.2 Determinación de marcadores.....	99
5.2.1 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata localizado.....	99
5.2.2 Correlación en la expresión de los diferentes marcadores estudiados.....	102
5.2.3 Relación de la expresión de los marcadores en tejido tumoral y no tumoral.....	105
5.2.4 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata metastásico.....	107
5.3 Análisis de tiempo libre de enfermedad en los tumores localizados.....	110
<b>6. Discusión</b> .....	112
6.1 Correlación entre la expresión de los factores a estudio y el PSA.....	116

6.2 Correlación entre los factores estromales y las características clínico-patológicas en tumores localizados.....	117
6.3 Correlación entre la expresión de los diferentes factores estromales en tumores localizados .....	119
6.4 Comparación de la expresión de los marcadores en tumores localizados con la de los tumores metastásicos.....	120
6.5 Relación en la expresión estromal y el tiempo libre de enfermedad en el cáncer de próstata localizado.....	124
6.6 Limitaciones.....	125
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>127</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>131</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>158</b>
9.1 Anexo I .....	160

# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Factores dietéticos asociados con el CaP

**Tabla 2.** Clasificación TNM para el CaP

**Tabla 3.** Grupos de riesgo de la EAU en CaP

**Tabla 4.** Sistema de grado (grupo) de la ISUP 2014

**Tabla 5.** Escala PI-RADS V2

**Tabla 6.** Sistema de Gleason modificado de la ISUP 2014

**Tabla 7.** Factores estromales analizados en el estudio

**Tabla 8.** Score Gleason en la biopsia de los tumores localizados

**Tabla 9.** Concordancia entre los resultados de la biopsia y la pieza de prostatectomía

**Tabla 10.** Distribución de casos según la ISUP

**Tabla 11.** Estadios pT de las piezas de prostatectomía

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Incidencia y mortalidad por cáncer de próstata por continente
- Figura 2.** Histopatología del adenocarcinoma de próstata
- Figura 3.** Componentes celulares de la glándula prostática humana
- Figura 4.** Interacción estroma-epitelio en la progresión del cáncer de próstata
- Figura 5.** Estructura del receptor androgénico
- Figura 6.** Mecanismos subyacentes a las funciones promotoras de tumores de FGF-10 en el CaP
- Figura 7.** Estructura básica de las metaloproteinasas
- Figura 8.** Obtención de muestras pareadas para diagnóstico y estudio
- Figura 9.** Imágenes de los cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento
- Figura 10.** Expresión de MMP-11 en relación con el estadio pT
- Figura 11.** Expresión de TGF- $\beta$ 1 en los CAF según el estadio pT
- Figura 12.** Expresión de MMP-2 según el Grado tumoral
- Figura 13.** Expresión de TGF- $\beta$ 1 con relación al grado tumoral
- Figura 14.** Correlaciones entre la expresión de RA con las de FGF-7, FGF-10 y HGF
- Figura 15.** Correlación entre las expresiones de FGF-7 y FGF-10
- Figura 16.** Correlación entre las expresiones de FGF-7 y HGH
- Figura 17.** Correlaciones entre MMP-2 y HGH
- Figura 18.** Correlaciones entre las expresiones de MMP-9 con TGF- $\beta$ 1
- Figura 19.** Aumento de expresión de FGF-7 en los tumores localizados
- Figura 20.** Sobreexpresión de MMP-2 en tumores localizados
- Figura 21.** Sobreexpresión de MMP-11 en tumores localizados frente a tejido normal
- Figura 22.** Disminución de la expresión de FGF-10 en tumores localizados
- Figura 23.** Disminución de la expresión de MMP-9 en tumores localizados
- Figura 24.** Expresión de FGF-7 en tumores metastásicos frente a tejido normal
- Figura 25.** Sobreexpresión de MMP-2 en el tumor metastásico
- Figura 26.** Aumento de expresión de MMP-11 en el tumor metastásico frente al normal
- Figura 27.** Disminución de expresión en tumores metastásicos de MMP-9 y de FGF-10
- Figura 28.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Expresión alta de FGF-10 menor tiempo hasta la recidiva bioquímica

# ABREVIATURAS

AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
5-ARI	Inhibidores de la 5 alfa reductasa
ARVs	Variantes de corte y empalme del receptor androgénico
AR-V7	Variante de corte y empalme del RA V7
BMP	Proteínas morfogénicas óseas
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer de próstata
CaP	Cáncer de próstata
CE	Exón críptico
CoA	Coactivadores
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CPL	Cáncer de próstata localizado
CPM+	Cáncer de próstata metastásico
CPRC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CPSC	Cáncer de próstata sensible a la castración
cT	Estadio clínico T
DBD	Dominio de unión al ADN
DHT	Dihidrotestosterona
DPSA	Densidad de PSA
EAU	European Association of Urology
EEUU	Estados Unidos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMA	Agencia Europea de Medicamentos

EMMPRIN	Inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular
EMT	Transición epitelio -mesenquimal
EPI	ExoDx Prostate Intelliscore
ETR	Ecografía transrectal
FBS	Suero fetal bovino
FC	Factores de crecimiento
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGF básico	FGFb
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FGF-7	Factor de crecimiento de fibroblastos 7
FGF-10	Factor de crecimiento de fibroblastos 10
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR2IIIb	Isoforma III b del Receptor 2 de FGF
GPS	Puntuación de próstata genómica
GS	Puntuación de Gleason
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HGF	Factor de crecimiento hepatocítico
HP	Hipertrofia de próstata
hK2	Antígeno 2 de la calicreína humana
HR	Región bisagra
HSPG	Glucosaminoglicanos de proteoglicanos heparan-sulfatados
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPDE-5	Inhibidor de la 5-fosfodiesterasa
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LAP	Péptido latente asociado
LBD	Dominio de unión al ligando
LTBP	Proteína asociada a TGF- $\beta$ latente
MAPK	Proteincinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP-2	Metaloproteinasa 2
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MMP-11	Metaloproteinasa 11
MMPs	Metaloproteinasas
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCOA	Coactivador del receptor nuclear
NF $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear kappa
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NTD	Dominio de transactivación N-terminal
PCA3	Antígeno 3 del cáncer de próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGF-B	Factor de crecimiento derivado de plaquetas B
PDGFR	Receptor para FC derivado de plaquetas

PET	Tomografía por emisión de positrones
PHI	Índice de salud prostática
PI3K	Fosfoinositido-3-quinasa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PIRADS	Prostate Imaging-Reporting and Data System
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno de membrana específico de próstata
pN	Afectación ganglionar
pT	Estadio patológico
RA	Receptor androgénico
RMmp	Resonancia magnética multiparamétrica de próstata
SF	Factor de dispersión
SMC	Células similares al músculo liso
TC	Tomografía computerizada
TF	Terapia focal
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinas
TIMP-1	Inhibidor tisular de la MMP-1
TK	Quinasas de tirosina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TNM	Clasificación de Tumores, ganglios y metástasis
tPA	Activador de plasminógeno de tipo tisular
TR	Tacto rectal
uPA	Activador de plasminógeno de tipo uroquinasa

VA	Vigilancia activa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VPSA	Velocidad de PSA

---

# 1. Introducción

---



## **1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.1.1 Epidemiología**

El cáncer de próstata (CaP) representa el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres, con un estimado de 1.1 millones de diagnósticos en todo el mundo en 2012, lo que representa el 15% de todos los cánceres diagnosticados; y es la tercera causa a nivel mundial de muerte por cáncer en hombres (1). En España y Europa es el primero en número de diagnósticos (32641 en España en 2014 y 436500 en Europa en 2012) (2), representando el 12% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados en Europa (3). Constituye en Estados Unidos y en Europa la neoplasia no cutánea maligna más frecuente en el hombre. Se estima un crecimiento de 1,7 nuevos casos en todo el mundo y 499.000 nuevas muertes para el año 2030 (4).

La incidencia del CaP se ha incrementado en países con mayor desarrollo socio-económico mostrando grandes variaciones geográficas, mientras que la mortalidad ha disminuido de manera paralela excepto en África (5). Los factores de riesgo establecidos para CaP son la edad avanzada, raza negra, antecedentes familiares de enfermedad y ciertos polimorfismos genéticos (6).

La incidencia del diagnóstico de CaP varía ampliamente entre las diferentes áreas geográficas, observándose la mayor incidencia en Australia / Nueva Zelanda (111.6 casos por 100.000 habitantes), Norteamérica, y el norte y oeste de Europa., en gran parte debido al uso de pruebas de antígeno prostático específico (PSA) y el envejecimiento de la población. La incidencia más baja es en el sur y Centro de Asia central (4.5 por 100000 habitantes), mientras que las tasas en Europa oriental y meridional, que fueron bajas, han mostrado un aumento constante (1)(5). Comparando la incidencia de CaP con la de Europa, España presentó una tasa de cáncer ligeramente inferior, aunque la estimación de la incidencia de este cáncer está influenciada por el uso del test del antígeno prostático específico (7).

En cuanto a la mortalidad hay una variación relativamente menor en las tasas de mortalidad en todo el mundo, la estimación de la mortalidad ajustada a la población mundial en 2012 fue de 7,8 casos por 100.000 (7,2 en 2008). Las tasas de mortalidad más altas se observaron en las poblaciones de ascendencia africana (Caribe: 29 por 100000 habitantes, y África subsahariana ,que oscilan entre 19 y 14 casos por 100000 habitantes); intermedio en los Estados Unidos (EEUU); y muy bajo en las regiones de Asia (2.9 por

100.000 habitantes). En general, las tasas de mortalidad siguen paralelas a las de incidencia, a excepción de África donde la mortalidad fue la más alta (7,0 por 100.000 habitantes) (1)(5). Dentro de los países europeos con menor tasa de mortalidad por CaP se encuentran España, Grecia, Francia e Italia. Los países nórdicos, centroeuropeos y EEUU, presentan una tasa de mortalidad más elevada. Las tasas de incidencia de CaP en Asia están entre las más bajas del mundo. (1).

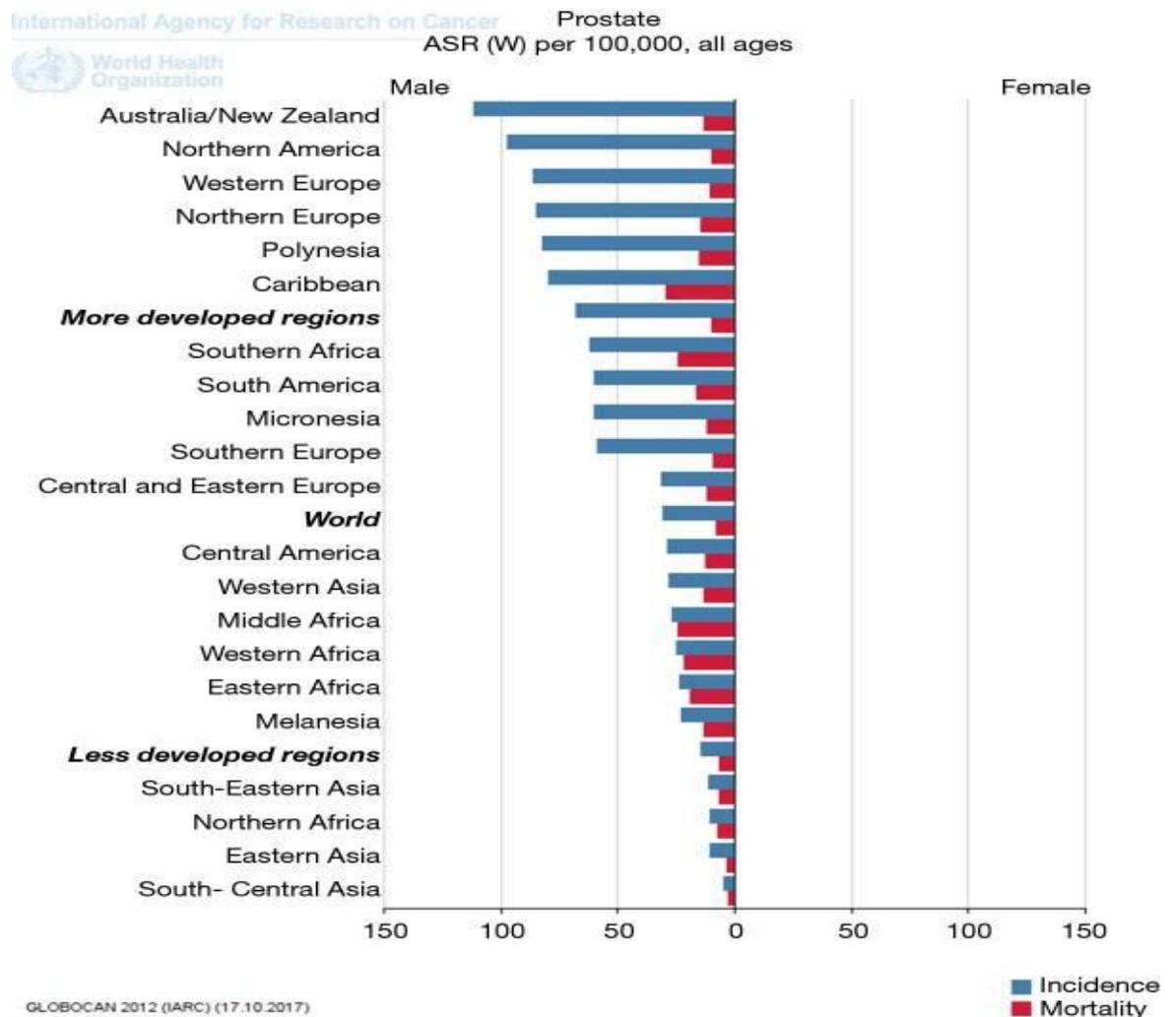


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer de próstata por continente. Mayor mortalidad observada en el Caribe, África Meridional, Central, Occidental y Oriental, extraído de Globocan 2012 (1)

Con todo ello, sumado al envejecimiento y el crecimiento de la población es de esperar un aumento en la incidencia de CaP. En España, a pesar del descenso en la

mortalidad, unos 5.500 varones fallecen cada año a consecuencia de este tumor, lo que supone un 2,8% del total de defunciones registradas en la población masculina española (1)(5).

Las nuevas opciones de tratamiento han mejorado las opciones terapéuticas y por ello las tasas de mortalidad del CaP se han reducido en la última década. Los nuevos fármacos orales como el acetato de abiraterona y enzalutamida inhiben la vía del receptor androgénico (RA) que permanece activa en el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

Sin embargo, hay a pesar de todo una ausencia de biomarcadores definidos para la selección de pacientes respondedores y para predecir la respuesta al tratamiento. No hay buenos marcadores de CaP y es así como el microambiente tumoral está emergiendo como una pieza fundamental en la progresión de la enfermedad y como un potencial blanco terapéutico (8).

### **1.1.2 Etiopatogenia y factores de riesgo**

La etiología del CaP o los agentes que favorecen la aparición del mismo son poco conocidos y más bien se considera como producto de un proceso multifactorial como ciertas exposiciones medioambientales, estilos de vida, historia familiar de CaP, y factores genéticos (6).

- **Edad**

La edad es uno de los mayores factores de riesgo para el CaP. Antes de los 45 años se diagnostican menos del 6% de todos los casos, y a partir de los 65 años un 62-85%. El CaP llega hasta el 80% a los 80 años en autopsias aunque la incidencia de cáncer clínico es mucho más baja (9). Esta gran diferencia también refleja el incremento asociado al cribado sistemático del PSA y del examen rectal a partir de los 50 años. Asimismo, con la edad aparecen las proliferaciones acinares atípicas y neoplasia intraepitelial prostática (PIN), lesiones bien conocidas como precursoras del CaP. El desarrollo de un PIN de bajo grado precisa de un período de latencia de aproximadamente 20 años. Su transformación en PIN de alto grado necesita de más de 10 años, y para convertirse éste en un carcinoma clínicamente detectable precisa además de un período evolutivo de entre 3 y 15 años (10). Por lo tanto, conociendo la historia natural del CaP, es lógico pensar que éste aparecerá a edades más avanzadas.

- **Factores étnicos-raciales y geográficos**

El riesgo de presentar CaP es el doble de frecuente en la raza negra que en la blanca o la asiática. Se ha discutido una amplia variedad de factores exógenos / ambientales asociados con el riesgo de desarrollar CaP (11). Los hombres japoneses tienen un menor riesgo de CaP en comparación con los hombres del mundo occidental. Sin embargo, a medida que los hombres japoneses se trasladan de Japón a California, su riesgo de CaP aumenta, acercándose al de los hombres estadounidenses, lo que implica un papel de factores ambientales o dietéticos (12).

- **Factores genéticos, familiares y hereditarios**

Los antecedentes familiares están asociados con una mayor incidencia de CaP, lo que sugiere una predisposición genética (13). Se estima que el 10% de los CaP son de origen hereditario, transmitidos por genes raros de alta penetrancia. Esto se define como tres o más familiares afectados o al menos dos familiares que han desarrollado CaP de inicio temprano (<55 años) (14). Si hay un familiar de primer grado afectado, el riesgo se dobla, y si hay dos, el riesgo se multiplica entre 5 y 11 veces (15). Se han identificado *loci* de riesgo específicos de la ascendencia, y los estudios de asociación de todo el genoma han identificado más de 100 *loci* de susceptibilidad comunes que contribuyen al riesgo de CaP (16)(17). De los determinantes subyacentes de la diversidad genómica y los mecanismos entre los factores genéticos y ambientales, queda mucho por saber. Sin embargo, se acepta que los hombres de ascendencia africana muestran una mayor incidencia de CaP y generalmente tienen un curso de enfermedad más agresivo (18).

Las mutaciones de la línea germinal también se han identificado cada vez más entre los hombres con CaP no hereditario. En pacientes con CaP metastásico, se encontró una incidencia de mutaciones de la línea germinal del 11,8% en los genes que median los procesos de reparación del ADN (19). Las mutaciones que se observaron con mayor frecuencia fueron *BRCA2* (5,35%), *ATM* (1,6%), *CHEK2* (1,9%), *BRCA1* (0,9%), y *PALB2* (0,4%). Un estudio de cohorte prospectivo de portadores masculinos de *BRCA1* y *BRCA2* confirmó la asociación entre *BRCA2* y CaP agresivo (20). Es así como el análisis genómico dirigido de estos genes podría ofrecer opciones para identificar familias con alto riesgo (21).

- **Factores hormonales**

Aunque parece que los Inhibidores de la 5-alfa-reductasa (5-ARI) tienen el potencial de prevenir o retrasar el desarrollo de CaP (Gleason 6)), esto debe sopesarse

contra los efectos secundarios relacionados con el tratamiento, así como el pequeño riesgo potencial de CaP de alto grado. Ninguno de los 5-ARI disponibles ha sido aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para quimioprevención (22). En hombres hipogonadales, los suplementos de testosterona no aumentan el riesgo de CaP (23).

- **Factores dietéticos**

Asociación entre una variedad de factores dietéticos y CaP (tabla 1).

**Tabla 1. Factores dietéticos asociados con el CaP (33)**

<b>Alcohol</b>	El alto consumo de alcohol, pero también la abstinencia total del alcohol, se ha asociado con un mayor riesgo de CaP y mortalidad específica por CaP (24)
<b>Leche</b>	Se encontró una correlación débil entre el alto consumo de proteínas de los productos lácteos y el riesgo de CaP (25)
<b>Grasas</b>	No se encontró asociación entre la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga y CaP. Puede existir una relación entre la ingesta de alimentos fritos y el riesgo de CaP (26)
<b>Tomates (licopenos / carotenos)</b>	Los ensayos controlados aleatorios que comparaban licopeno con placebo no identificaron una disminución significativa en la incidencia de CaP (27)
<b>Carne</b>	Un metanálisis no mostró una asociación entre la carne roja o el consumo de carne procesada y CaP (28)
<b>Fitoestrógenos</b>	La ingesta de fitoestrógenos se asoció significativamente con un riesgo reducido de CaP en un metanálisis (29)
<b>Soja (fitoestrógenos [isoflavonas ])</b>	La ingesta total de alimentos de soja se ha asociado con un menor riesgo de CaP, pero también con un mayor riesgo de enfermedad avanzada (30)
<b>Vitamina D</b>	Se ha observado que concentraciones bajas y altas de vitamina D se asocian con un mayor riesgo de CaP, y más fuertemente para la enfermedad de alto grado (31)
<b>Vitamina E / Selenio</b>	Se encontró que la suplementación con selenio y vitamina E no afecta la incidencia de CaP (32)

- **Otros factores de riesgo**

Los componentes individuales de la hipertensión arterial y la circunferencia de la cintura > 102 cm se han asociado con un riesgo significativamente mayor de CaP (34). A nivel de la población, se encontró que los usuarios de metformina, tenían un menor riesgo de diagnóstico de CaP en comparación con los que nunca usaron (35). La obesidad se asoció con un menor riesgo de CaP de bajo grado en análisis multivariados, pero un mayor riesgo de CaP de alto grado (34).

Además, la calvicie se asoció con un mayor riesgo de CaP (33). El tabaquismo se asoció con un mayor riesgo de muerte por CaP; sin embargo, otros estudios no lo han podido demostrar (36). La gonorrea se asoció con un mayor riesgo de muerte por CaP (33). Un metaanálisis sobre cadmio encontró una asociación entre la alta exposición a cadmio y el riesgo de CaP por exposición ocupacional, pero no por exposición no ocupacional, potencialmente debido a niveles más altos del mismo (37). Una frecuencia de eyaculación más alta ( $\geq 21$  veces al mes frente a 4 a 7 veces) se ha asociado con un riesgo 20% menor de CaP (38). Otro factor como la vasectomía, según los diferentes estudios que han analizado su asociación con CaP, ha ofrecido resultados contradictorios. A las publicaciones que reportaban una asociación positiva entre vasectomía y CaP se siguieron de otros numerosos estudios que no encontraban dicha asociación (33).

Las asociaciones con CaP identificadas hasta la fecha carecen de evidencia de causalidad. Como consecuencia, no hay datos que sugieran estrategias preventivas efectivas.

### **1.1.3 Patología de las neoplasias prostáticas**

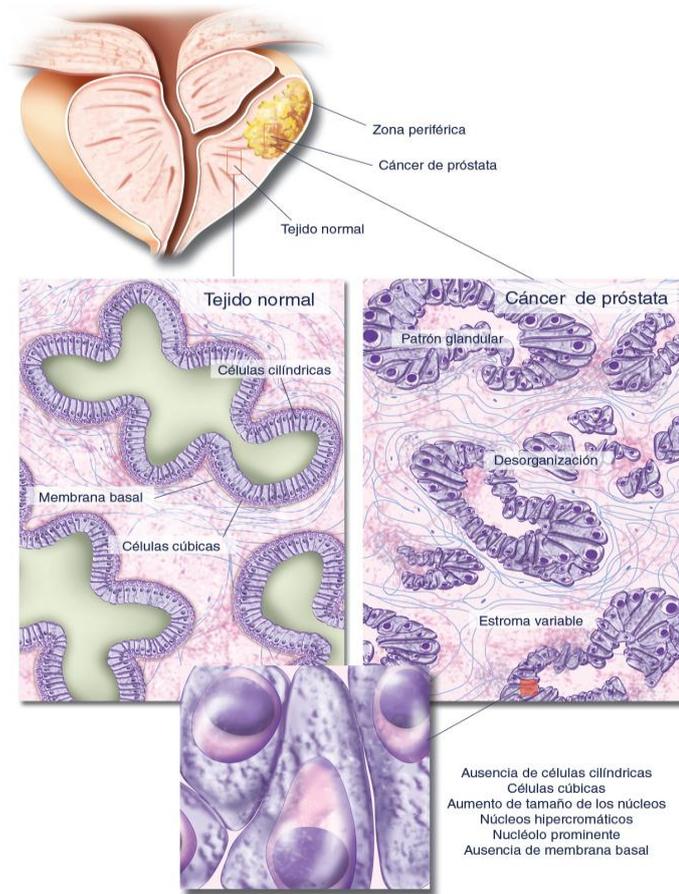
La próstata es una glándula que rodea la porción inicial de la uretra. Está formada por un conglomerado de 30 a 50 pequeñas glándulas túbulo-alveolares que están contenidas en un estroma fibroelástico. Dicho estroma está constituido por una red de fibras musculares lisas y de tejido conectivo rico en fibras elásticas (39).

La PIN está compuesta por acinos con estructura benigna, tapizados por células con atipia nuclear. Se clasifica PIN de bajo grado para referirse a cambios discretos y PIN de alto grado para referirse a cambios prominentes (9).

De todos los tumores de próstata, el adenocarcinoma acinar constituye el 95%, aunque existen variantes del adenocarcinoma y otros tipos histológicos como carcinoma ductal siendo hormonorresistente, carcinoma neuroendocrino, de células pequeñas, de células en anillo de sello, sarcomatoide, cribiforme, escamoso, rabdomiosarcoma o metastásico (9).

El 85% de CaP aparece en la zona periférica de la glándula prostática, el 10-15% en zona transicional, y el 5-10% en la central. Estos tumores invaden el estroma circundante hasta diseminarse fuera de la glándula a través de los espacios perineurales o directamente tras la invasión de la cápsula a estructuras vecinas como las vesículas seminales o el cuello vesical. El primer punto de diseminación a distancia se produce en

los ganglios linfáticos regionales y al hueso. Las metástasis en tejidos blandos se dan en fases avanzadas de la enfermedad y su hallazgo se asocia con escaso pronóstico vital (40).



**Figura 2. Histopatología del adenocarcinoma de próstata (9)**

### **1.1.4 Sistemas de clasificación**

Se utiliza la clasificación de tumores, ganglios y metástasis (TNM) de 2017 para la estadificación del CaP (tabla 2), y la clasificación de grupos de riesgo de la European Association of Urology (EAU), que se basa esencialmente en el sistema de clasificación de D'Amico para el CaP (tabla 3) (33).

**Tabla 2. Clasificación TNM para el CaP (33)**

<b>T: tumor primario (estadío basado en el tacto rectal únicamente)</b>	
TX	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor clínicamente inaparente que no es palpable
T1a	Hallazgo histológico incidental del tumor en el 5% o menos del tejido resecado
T1b	Hallazgo histológico incidental del tumor en más del 5% del tejido resecado
T1c	Tumor identificado por biopsia con aguja (p. Ej., Debido a un antígeno prostático específico elevado [PSA])
T2	Tumor palpable y confinado dentro de la próstata.
T2a	El tumor afecta la mitad de un lóbulo o menos
T2b	El tumor afecta más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos.
T2c	El tumor afecta a ambos lóbulos
T3	El tumor se extiende a través de la cápsula prostática.
T3a	Extensión extracapsular (unilateral o bilateral)
T3b	El tumor invade las vesículas seminales
T4	El tumor se fija o invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores y / o pared pélvica
<b>N - Ganglios linfáticos regionales (pélvicos) 1</b>	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en ganglios linfáticos regionales
<b>M - Metástasis a distancia 2</b>	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis distante
	M1a Ganglios linfáticos no regionales
	M1b Hueso (s)
	M1c Otro (s) sitio (s)

**Tabla 3. Grupos de riesgo de la EAU en CaP**

(GS = puntuación de Gleason; ISUP = Sociedad Internacional de Patología Urológica; PSA = antígeno prostático específico)

Definición			
Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Alto riesgo	
PSA <10 ng / mL	PSA 10-20 ng / ml	PSA > 20 ng / mL	cualquier PSA
y GS <7 (ISUP grado 1)	o GS 7 (ISUP grado 2/3)	o GS > 7 (ISUP grado 4/5)	cualquier GS (cualquier grado ISUP)
y cT1-2a	o cT2b	o cT2c	cT3-4 o cN +
Localizado			Localmente avanzado

En el sistema de clasificación de Gleason original, se distinguieron 5 grados de Gleason (que van de 1 a 5) basados en la arquitectura histológica del tumor, pero en 2005 y las posteriores modificaciones de la puntuación de Gleason (GS) de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) de 2014, los grados 1 y Gleason de 2 fueron eliminados (Tabla 4) (33).

**Tabla 4: Sistema de grado (grupo) de la Sociedad Internacional de Patología Urológica 2014**

Puntuación de Gleason	Grado ISUP
2-6	1
7 (3 + 4)	2
7 (4 + 3)	3
8 (4 + 4 o 3 + 5 o 5 + 3)	4
9-10	5

### 1.1.5 Cribado y Diagnóstico

El cribado (screening) a nivel poblacional es recomendable para pacientes con mayor riesgo de padecer CaP (9) para conseguir objetivos como la reducción de la mortalidad por CaP (33).

El CaP es sospechado al hacer un tacto rectal (TR) y/o la medición de niveles PSA en sangre. El diagnóstico definitivo depende de la verificación histopatológica del adenocarcinoma en los núcleos de biopsia de próstata (33).

El CaP raramente es sintomático, siendo asintomático en el inicio de la enfermedad. La presencia de síntomas sugiere enfermedad localmente avanzada o metastásica, como uropatía obstructiva por extensión hacia el trígono vesical, hematospermia, hematuria, rectorragia o dolor óseo (9).

- **Tacto rectal**

Desde la introducción en la clínica del PSA, el TR ha ido perdiendo protagonismo en su papel diagnóstico y pronóstico del CaP. Aproximadamente en el 18% de los casos el CaP se detecta únicamente mediante el TR sospechoso, independientemente del nivel de PSA (33).

- **El PSA en el diagnóstico precoz del CaP**

El PSA es una glicoproteína que primariamente se sintetiza en el epitelio de la glándula prostática y de las glándulas periuretrales. Se trata de una proteasa que se elimina en el líquido prostático y cuya acción fisiológica es la de licuar el coágulo seminal incrementando de esta manera la movilidad espermática. La concentración de PSA en el fluido seminal es muy elevada, mayor a 1 millón de nanogramos por mililitro; sin embargo, en condiciones fisiológicas, su concentración en sangre periférica es mínima. El PSA fue identificado en extractos de tejido prostático humano en 1970, posteriormente purificado y caracterizado en 1979 y detectado en suero en 1980. Aunque el PSA no es una proteína específica para el CaP, sino de tejido prostático, fue identificado como posible marcador del CaP (41). El PSA no es específico del cáncer; por lo tanto, puede estar elevado en hiperplasia benigna de próstata (HBP), prostatitis y otras afecciones no malignas (42).

El empleo rutinario del PSA como prueba diagnóstica ha permitido el diagnóstico en fases cada vez más precoces del CaP. Los niveles elevados de PSA (generalmente superiores a 4 ng/ml) en la sangre es la forma en que el 80% de los cánceres se presentan inicialmente, aunque los niveles elevados de PSA por sí solos identifican correctamente en CaP sólo el 25-30 % de los casos de CaP. Se recomienda al menos dos niveles anormales de PSA o la presencia de un nódulo palpable en el TR para justificar una biopsia prostática y una mayor investigación (43).

El problema del PSA cuando se emplea como prueba de cribado para detectar CaP clínicamente curables es su baja especificidad, pudiendo generar un número excesivo de biopsias prostáticas innecesarias. Para evitar esto se debe seleccionar de manera más precisa a los pacientes que se beneficiarán de una biopsia de próstata, y evitar sobrediagnósticos y sobretratamiento. Por ello, con el fin de aumentar la especificidad del PSA y por consiguiente incrementar la predicción del CaP, se han desarrollado los siguientes conceptos (44):

- ✓ **PSA libre y total:** Actualmente, en la circulación sistémica se reconocen tres formas de PSA: la menor proporción de PSA sérico se encuentra libre; la mayoría del PSA está unido a alfa-1-antiquimiotripsina; la tercera forma de PSA está unida a alfa-2-macroglobulina (45). El porcentaje de PSA libre en la sangre puede ser un indicador útil de malignidad. El PSA libre se calcula multiplicando el nivel de PSA libre por 100 y dividiendo por el valor total de PSA. Si el porcentaje de PSA libre es superior al 25% el riesgo de CaP es inferior al 10%, y si el porcentaje de PSA libre es inferior al 10%, el riesgo de cáncer es de aproximadamente el 50% (44).
- ✓ **PSA y edad:** Con el objetivo de aumentar la sensibilidad en el diagnóstico del CaP en menores de 60 años y aumentar la especificidad en los mayores a esta edad, Oesterling introdujo en 1993 el concepto de rangos de referencia específicos de PSA-edad. Se establecía un PSA de 2 para menores de 49 años, de 3 para menores de 59 años, de 4 para menores de 69 años y de 5,5 para menores de 79 años (46). En cualquier caso, la “Food and Drug Administration” (FDA) no recomienda el uso de los rangos de PSA específicos de edad.
- ✓ La **densidad de PSA** (DPSA): se introdujo para corregir el nivel de PSA en relación al tamaño de la glándula prostática según la fórmula: PSA total (en ng/mL) dividido por el volumen prostático en centímetros cúbicos medido mediante ecografía transrectal o resonancia magnética. La densidad de PSA está destinada a minimizar el efecto del agrandamiento prostático benigno. En general, si la densidad de PSA es superior a 0.15 se considera sugestivo de malignidad (47).
- ✓ La **velocidad de PSA** (VPSA) compara los niveles séricos anuales de PSA. Una velocidad superior a los 0.75ng/mL/año es muy sugestiva de CaP (48).

- **Biomarcadores**
- ✓ **Biomarcadores sanguíneos**
  - El **índice de salud prostática (PHI)** es un análisis de sangre que incluye el PSA total, el PSA libre y la isoforma [-2] proPSA del PSA. Se utiliza una fórmula para combinar matemáticamente los resultados de estas pruebas para obtener la puntuación de PHI. Esta puntuación de PHI parece ser superior al PSA, PSA libre y total, y PCA3 para predecir la presencia de CaP (49).
  - La prueba de **“4K score”** establece una relación entre parámetros clínicos (edad, tacto rectal e historia previa) y biomarcadores (PSA, PSA libre, PSA intacto y antígeno 2 de la calicreína humana (hK2)) para obtener una puntuación que determinará la probabilidad de presentar CaP de alto riesgo (9). Un “4k Score” bajo (< 7,5%) indica que una biopsia de próstata se puede diferir con seguridad. Debido a su rentabilidad, este test está incluido en las actuales guías de “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN) para la detección precoz de CaP (50).
  - **IsoPSA** utiliza una tecnología novedosa que se centra en la estructura de PSA. Usando una solución acuosa de dos fases, divide las isoformas de PSA y evalúa los cambios estructurales en PSA (33).
- ✓ **Biomarcadores en orina**
  - El **antígeno 3 del cáncer de próstata (PCA3)** es un marcador genético específico para CaP que cuantifica el gen en una muestra de orina recogida tras un masaje prostático. Si el PCA3 está elevado, con un punto de corte de 35, sugiere la presencia de CaP. Su resultado es más fiable que el PSA ya que es independiente del volumen de la próstata. El PCA3 se utiliza en pacientes con biopsia previa negativa y sospecha mantenida de CaP (51).
  - **“Select MDx”**: esta prueba se basa de manera similar en el aislamiento de biomarcadores de ARNm de la orina. La presencia de niveles de ARNm de biomarcadores génicos (HOXC6 y DLX1) se evalúa para proporcionar una estimación del riesgo tanto de la presencia de CaP en la biopsia como de la presencia de cáncer de alto riesgo (33).

- **“ExoDx Prostate Intelliscore (EPI)”**: la prueba analiza el ARN exosómico en busca de tres biomarcadores que se sabe que se expresan en la orina de hombres con CaP de alto grado. Posteriormente, se utiliza un algoritmo patentado para asignar una puntuación de riesgo que predice la presencia de CaP de alto grado (puntuación de Gleason  $\geq 7$ ; o cualquier grado de Gleason = a 4 o 5). A diferencia de otras pruebas de orina para el CaP no se requiere un TR ni un masaje prostático. El valor predictivo negativo es del 91,3% con un índice de sensibilidad del 91,9% (52).
- **Pruebas de imagen**

El TR y el PSA evalúan la extensión del CaP, y pueden complementarse con la Resonancia magnética multiparamétrica de próstata (RMmp), y tomografía computarizada (TC) (33).

La ecografía y la resonancia magnética son las principales técnicas de imagen utilizadas para la detección y diagnóstico inicial del CaP.

✓ **Ecografía transrectal (ETR)**

La ETR es una prueba poco fiable para determinar la malignidad de una lesión, y no es más precisa para predecir enfermedad confinada al órgano que el TR (33).

✓ **La RMmp**

En los últimos años, los avances tecnológicos (espectroscopia, secuencias de difusión, secuencias dinámicas con contraste) han supuesto grandes cambios en el papel que puede desempeñar esta prueba en el diagnóstico, la estadificación y el seguimiento del CaP (9).

La RMmp no sólo aporta información anatómica de la glándula, también datos sobre el volumen, vascularización y celularidad (53). Puede identificar áreas de la glándula que son realmente "sospechosas" con un alto grado de precisión y confiabilidad con un valor predictivo positivo (VPP) superior al 90%, convirtiéndose en una modalidad de imagen estándar para el diagnóstico de CaP debido a que puede identificar y clasificar los nódulos prostáticos sospechosos para ayudar con la estadificación y la localización, verificar la extensión extracapsular, evaluar las vesículas seminales, y determinar el agrandamiento de los ganglios linfáticos regionales que podrían indicar una enfermedad metastásica temprana. Además, se puede aumentar la rentabilidad diagnóstica de la biopsia de próstata realizando disparos dirigidos por fusión de imagen

sobre los focos sospechosos, si bien uno de los problemas de este sistema es la escasa disponibilidad y los costes elevados que supone (54). Aunque la RMmp presenta baja sensibilidad para la detección de la extensión extracapsular focal (microscópica) y de ganglios linfáticos metastatizados, es la prueba de imagen de elección para la estadificación locorregional en tumores de alto riesgo/localmente avanzados (9).

La RMmp permite, a través del sistema de gradación “Prostate Imaging – Reporting and Data System”, en su segunda versión (PI-RADS V2), identificar y clasificar las lesiones sospechosas para así dirigir las biopsias y hacerlas más selectivas (55). PI-RADS V2 utiliza una escala de evaluación de 5 puntos que indica la probabilidad de que los hallazgos de RMmp se correlacionen con la presencia de CaP clínicamente significativo en una ubicación anatómica particular. Las categorías de evaluación de PI-RADS V2 se definen con las siguientes puntuaciones ( tabla 5) (56) :

**Tabla 5. Escala de PI-RADS V2**

PI-RADS
PI-RADS 1= Muy bajo (es muy poco probable que haya CaP clínicamente significativo)
PI-RADS 2 = Bajo (es poco probable que haya CaP clínicamente significativo)
PI-RADS 3 = Intermedio (la presencia de enfermedad por CaP clínicamente es ambigua)
PI-RADS 4 = Alto (es probable que haya CaP clínicamente significativo)
PI-RADS 5 = Muy alto (es muy probable que haya CaP clínicamente significativo)

El grado de variabilidad en la interpretación de imágenes hace que sea difícil confiar solo en la RMmp ya que el valor predictivo negativo (VPN) llega a ser incluso de hasta el 80% en algunos estudios (53). Un metaanálisis reciente concluyó que el factor predictivo más útil de no encontrar cáncer de próstata significativo en hombres con estudios de RMmp negativos era una densidad de PSA inferior a 0,15 ng / ml (57).

✓ **TC**

Al igual que en la RMmp, la evaluación de afectación de ganglios linfáticos mediante TC se basa en el tamaño, por lo que su sensibilidad en este aspecto es también baja. Por otra parte, la TC es una prueba sensible y específica para la evaluación de la

afectación visceral a distancia, cuya realización se recomienda en pacientes con tumores de alto riesgo/localmente avanzados (9).

✓ **Gammagrafía ósea**

La gammagrafía ósea es la prueba más ampliamente utilizada para evaluar la presencia de metástasis óseas por su elevado VPN (87- 100%). Sin embargo, presenta una especificidad relativamente baja, por lo que en pacientes con alteraciones inespecíficas es conveniente realizar otras pruebas de confirmación (RMmp, PET) (9).

✓ **Tomografía por emisión de positrones (PET)/ TC de colina**

Se han desarrollado nuevos radiofármacos como el 11-colina y el 18-Fcolina, con mayor especificidad para el CaP (9). La sensibilidad de la PET / TC con colina aumenta al 50% en pacientes de alto riesgo y al 71% en pacientes de muy alto riesgo, superando en ambos casos a la TC con contraste (33).

✓ **PET/ TC basado en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA PET/TC)**

La Tomografía por emisión de positrones basada en antígeno de membrana específico de próstata ( PSMA) correlacionada con la tomografía computarizada está emergiendo rápidamente para la estadificación del CaP intermedio y avanzado (58).

• **Biopsia prostática**

La biopsia de próstata ecodirigida es la prueba más importante para tener el diagnóstico definitivo de CaP al analizar las muestras obtenidas. La necesidad de una biopsia de próstata se basa en el nivel de PSA y/o TR y/o imágenes sospechosas, teniendo que considerar la edad, la comorbilidad potencial y las consecuencias terapéuticas (33). La biopsia de próstata se realiza por abordaje transrectal o transperineal, aunque la forma habitual es por vía transrectal y se realiza a través de la zona periférica de la próstata (9). Se recomiendan al menos 8 biopsias sistemáticas en próstatas con un tamaño de aproximadamente 30 cc (59), y biopsias de diez a 12 núcleos en próstatas más grandes; con > 12 núcleos no son significativamente más concluyentes (60).

Con el análisis patológico de las muestras de la biopsia prostática se identifica la estirpe del tumor y su clasificación según su arquitectura celular, mediante la clasificación de Gleason. El GS de 2005 ISUP modificado de CaP detectado por biopsia comprende el grado de Gleason del patrón más extenso (primario), más el segundo patrón más común (secundario), si hay dos presentes. Si hay un patrón presente, debe duplicarse para producir el GS. Para tres grados, la biopsia GS comprende el grado más común más el grado más alto, independientemente de su extensión (33).

Ya hemos mencionado como desde el año 2014 la ISUP simplifica esta clasificación, y limita el número de grados de CaP que van de 1 a 5 (61), aportando esta simplificación una mejor estimación pronóstica cuando se incluye en un perfil de riesgo como el de D'Amico (62).

**Tabla 6. Sistema de Gleason modificado de la Sociedad Internacional de Patología Urológica 2014 (61)**

<b>ISUP</b>	<b>Gleason</b>	<b>Definición</b>
1	2-6	Sólo glándulas bien formadas
2	7(3+4)	Predominan glándulas bien formadas con un menor componente de glándulas cribiformes, fusionadas o pobremente formadas
3	7(4+3)	Predominan glándulas cribiformes, fusionadas y mal formadas y menor componente de glándulas bien formadas
4	8(4+4)	Sólo glándulas cribiformes, fusionadas o mal formadas
	8(3+5)	Predominan glándulas bien formadas y un menor componente sin glándulas o con necrosis
	8(5+3)	Predomina componente con ausencia de glándulas o con necrosis y menor número de células bien formadas
5	9-10	Ausencia de diferenciación glandular o necrosis, con o sin glándulas cribiformes, mal formadas o fusionadas

A pesar de todo, la tasa de falsos negativos de la biopsia llega al 20%-30% de los pacientes , y muchos de los pacientes, en más del 40%, serán sometidos a una nueva biopsia de próstata o a seguimientos en consulta de forma estrecha ante los parámetros alterados que pueden sugerir la existencia de enfermedad (63).

### **1.1.6 Tratamiento del cáncer de próstata**

Existen diversas opciones terapéuticas para este tipo de pacientes, debiendo elegir la mejor estrategia de tratamiento que proporcione el mayor tiempo libre de enfermedad con la menor morbilidad.

- **Cáncer de próstata localizado**

- ✓ **Vigilancia expectante**

Se ofrece a los pacientes que no son elegibles para tratamiento curativo local y tienen una esperanza de vida corta. La decisión de iniciar tratamiento no curativo debe basarse en los síntomas y en la progresión de la enfermedad (33).

- ✓ **Vigilancia activa**

La vigilancia activa (VA) es una opción terapéutica válida para pacientes con CaP de bajo riesgo y cuidadosamente seleccionados. Durante la VA el CaP se monitoriza minuciosamente para comprobar si hay signos de avance de la enfermedad (9). En tumores de grado intermedio, de menor riesgo y seleccionados (Gleason 3 + 4 = 7 con un PSA < de 10) es controvertido (33). Entre los criterios de selección encontramos los criterios de Epstein: > 10 años de expectativa de vida, PSA < 10 ng/ml, Gleason 6, densidad de PSA < 0,15 ng/ml/cc, un máximo de 2 cilindros afectados y ninguno con afectación > 50% o > 3 mm, cT1/2a. El objetivo es reducir el sobretratamiento en pacientes con CaP de bajo riesgo clínicamente localizado, minimizando los efectos secundarios, relacionados con el tratamiento, sin comprometer la supervivencia (9). Se precisan evaluaciones periódicas con PSA, TR, resonancia magnética multiparamétrica, y re-biopsia prostática (33).

- ✓ **Prostatectomía radical**

Procedimiento estándar para el CaP localizado (9). Se ofrece a pacientes con esperanza de vida de más de diez años. La linfadenectomía no está indicada en CaP de bajo riesgo (33).

- ✓ **Radioterapia**

La radioterapia externa se aplica en tumores de bajo riesgo, intermedio o alto riesgo. La braquiterapia transperineal en aquellos pacientes sin clínica obstructiva con tumores prostáticos de bajo riesgo (9).

- ✓ **Terapia focal (TF)**

Alternativa mínimamente invasiva en el tratamiento de CaP localizado para pacientes de bajo riesgo. La TF es una estrategia que podría complementar las actuales posibilidades de elección a través de la ablación selectiva del cáncer significativo (index lesión), a la vez que se preservan las funciones comprometidas por los tratamientos radicales y monitorizando el tejido benigno o el cáncer insignificante no tratado

(microfocos satélites que no representan riesgo vital para el paciente). La TF, por tanto, tendría las mismas indicaciones que la VA y podría extenderse a aquellos de riesgo intermedio con PSA < 15 ng/ml y Gleason 7 (3 + 4) en los que las pruebas de localización por RMmp pudiesen delimita el tumor a tratar, preferentemente unilateral (9).

- **Cáncer de próstata localmente avanzado**

Se puede ofrecer prostatectomía radical a pacientes seleccionados con CaP localmente avanzado como parte de terapia multimodal (33). La combinación de radioterapia con la terapia de supresión androgénica ha demostrado mayor supervivencia global y libre de enfermedad en los pacientes con CaP de alto riesgo con enfermedad localmente avanzada (9).

- **Cáncer de próstata metastásico**

La terapia hormonal, la radioterapia limitada, los radiofármacos, la inmunoterapia y la quimioterapia son los tratamientos estándar reservados para una enfermedad que se ha extendido más allá de la próstata, y ya no se considera curable. Por ejemplo, la radioterapia limitada puede ayudar de manera espectacular a controlar el sangrado prostático o aliviar el dolor de huesos insoportable de un depósito de cáncer metastásico (64).

### **1.1.7 Valoración del pronóstico del cáncer de próstata**

Existen varias clasificaciones y escalas para estratificar el riesgo de recidiva de la enfermedad; así desde 1998 la clasificación de riesgo descrita por D'Amico, en la que según el PSA, Gleason de la biopsia y el estadio Clínico T (cT) de la enfermedad, los pacientes tienen bajo, intermedio o alto riesgo de recidiva bioquímica posterior al tratamiento (62). En los últimos años, existen nomogramas que también analizan estos parámetros, como Briganti, Partin y Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) para predecir la invasión de los ganglios linfáticos, y ayudar así a los cirujanos, según el riesgo, a tomar la decisión de hacer cirugías con linfadenectomía de mayor o menor extensión (65).

- **Nuevos test biomarcadores para CaP**

Además del análisis anatomopatológico, en casos de prostatectomía radical, donde junto con el Gleason se tendrán muy en cuenta el estadio T de la enfermedad (afectación capsular, presencia de márgenes) así como la invasión linfovascular, y la afectación ganglionar (en caso de linfadenectomía) para la valoración del pronóstico de la

enfermedad (66). La investigación de biomarcadores de cáncer de próstata ha ampliado sus horizontes con el descubrimiento de varios biomarcadores alternativos prometedores que muestran una sensibilidad y especificidad mejoradas con respecto al PSA:

✓ **ConfirmMDx**

Esta prueba se basa en el concepto de que el tejido prostático benigno en las proximidades de un foco de CaP muestra distintas alteraciones epigenéticas. En caso de que el CaP se pierda en la biopsia, la demostración de cambios epigenéticos en el tejido benigno indicaría la presencia de carcinoma. La prueba ConfirmMDX cuantifica el nivel de metilación de las regiones promotoras de tres genes (*APC* metilado, *RASSF1* y *GSTP1*) en tejido prostático benigno. Destinada a definir los pacientes que no van a necesitar re-biopsia, evitando así nuevas biopsias innecesarias (33).

✓ **Oncotype DX**

Prueba que evalúa la actividad de un conjunto de 17 genes de expresión de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y que están involucrados en cuatro vías biológicas diferentes, incluida la vía de los andrógenos (*AZGP1*, *KLK2*, *SRD5A2*, *RAM13C*), la proliferación (*TPX2*), la organización celular (*FLNC*, *GSN*, *TPM2*, *GSTM2*) y la respuesta estromal (*BGN*, *COL1A1* y *SFRP4*). Estas medidas se combinan algorítmicamente para calcular una puntuación de próstata genómica (GPS). Este ensayo ha sido validado analíticamente y clínicamente como predictor de cáncer de próstata agresivo y permite la estratificación del riesgo de cáncer de próstata para guiar a los médicos en la toma de decisiones de tratamiento (67).

✓ **ProMark**

Prueba de pronóstico basada en proteínas para predecir la agresividad del cáncer de próstata, particularmente en pacientes con puntuaciones de Gleason 3 + 3 o 3 + 4. Esta prueba mide la expresión de ocho proteínas (*DERL1*, *CUL2*, *SMAD4*, *PDSS2*, *HSPA9*, *FUS*, *S6* fosforilado, *YBOX1*) en secciones de tejido de biopsia empleando un método de inmunofluorescencia automatizado. Sobre la base de los niveles de expresión de estas ocho proteínas, se calcula una puntuación de riesgo, y puede ayudar a estratificar a los pacientes para la vigilancia activa frente a la intervención terapéutica (68).

✓ **Prolaris Test**

Esta prueba mide la expresión de un conjunto de 31 genes de progresión del ciclo celular y 15 genes de mantenimiento para predecir la progresión de la enfermedad. Una expresión baja de estos genes se asocia con un riesgo bajo de progresión y esos hombres pueden ser candidatos para la vigilancia activa, mientras que una expresión alta se asocia

con un riesgo más alto de progresión de la enfermedad en los hombres que pueden ser tratados. Esta prueba es significativamente más pronóstica que las variables clínico-patológicas utilizadas actualmente, y también estima el riesgo de recidiva bioquímica tras prostatectomía (69).

#### ✓ **Deleciones del gen PTEN**

*PTEN* es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 10 que comúnmente se pierde en el cáncer de próstata. Esta pérdida conduce a la activación de la vía de señalización de la fosfoinositido-3-quinasa (PI3K), que juega un papel fundamental en el crecimiento, proliferación y metástasis celular y, además, a la inhibición de la vía de señalización del receptor de andrógenos (70). Las deleciones de *PTEN* se asocian con un mal pronóstico y una enfermedad hormonorrefractaria, y se utilizan como un biomarcador predictivo de la respuesta al tratamiento (71).

#### ✓ **Otros biomarcadores**

Los compuestos orgánicos volátiles (COV), detectados en orina, son una serie de marcadores biológicos alternativos. Durante el crecimiento del tumor se producen una serie de cambios en las proteínas de las células tumorales, cambios que conducen a la producción de COV que pueden detectarse en el aire espirado (72).

La nueva generación de biomarcadores de cáncer de próstata parece prometedora y puede ayudar a cumplir con los desafíos clínicos no resueltos hasta ahora, y guiar a los médicos hacia mejores diagnósticos y mejores opciones de tratamiento para el cáncer de próstata (44).

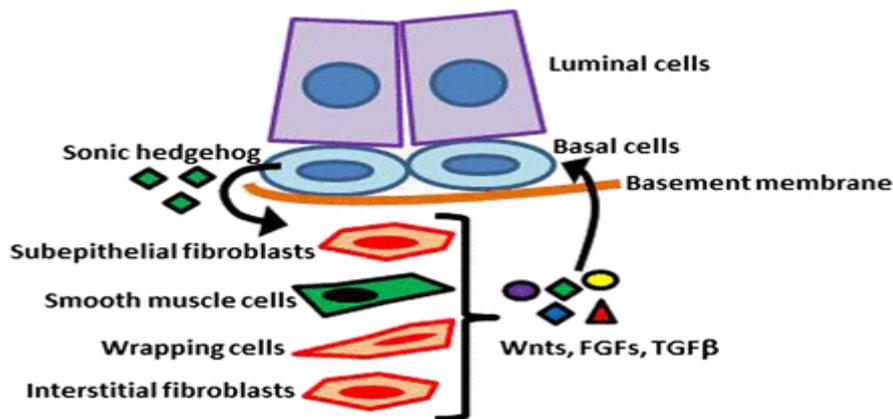
## **1.2 CÁNCER DE PRÓSTATA Y ESTROMA REACTIVO**

La glándula prostática está organizada en compartimentos epiteliales luminales y estromales (73). El epitelio prostático se divide en dos capas; la capa basal, próxima a la membrana basal, formada por células cuboideas, y una capa de células secretoras columnares o células luminales. La membrana basal separa las glándulas del estroma fibromuscular prostático compuesto por células y una matriz extracelular (MEC) rica en fibras de colágeno (74).

Los principales tipos de células del estroma de la próstata incluyen fibroblastos, miofibroblastos, las células del músculo liso, que regulan el crecimiento prostático benigno en condiciones normales (75); y células endoteliales adicionales, nervios, linfocitos y mastocitos infiltrantes (74). Las células del estroma secretan factores de

crecimiento, producen matriz extracelular, y expresan el RA, receptor de estrógeno, receptor adrenérgico y 5- $\alpha$  reductasa (76). Así, el estroma no solo sostiene físicamente el epitelio glandular, sino que también contribuye al microambiente endocrino y paracrino (74).

Los fibroblastos son las células estromales más importantes (75) constituyendo la población de células predominantes en el estroma tumoral. Expresan vimentina y laminina, mientras que las células de músculo liso expresan desmina,  $\alpha$ -actina, calponina, caldesmón, miosina, smoothelin y la distrofina, y los miofibroblastos característicamente expresan procolágeno-1 (76). Los fibroblastos son los responsables de la síntesis y el depósito de los componentes de la MEC, y participan en procesos fisiológicos como en la angiogénesis o reparación tisular (75).



**Figura 3. Componentes celulares de la glándula prostática humana (77)**

Tradicionalmente, la búsqueda de los factores predictivos, bien histológicos o moleculares, de la mayoría de los carcinomas se ha centrado en las propias células epiteliales, dado que los carcinomas derivan del compartimento epitelial. Sin embargo, diversos investigadores han observado un papel significativo del estroma, pues en muchas neoplasias está alterado tanto en su composición celular como en el fenotipo de su matriz extracelular y de los fibroblastos que lo componen (74). El CaP es un modelo ideal para la investigación básica y clínica de la influencia del ambiente peritumoral en las diferentes fases de la carcinogénesis (78).

El estroma tumoral prostático presenta muchas características del que aparece en la curación de heridas, descrito como estroma reactivo, si bien se produce en contextos

completamente diferentes (79). El estroma reactivo en el tejido del CaP se caracteriza por un aumento de miofibroblastos y fibroblastos, con una disminución o pérdida significativa de las células del músculo liso a medida que avanza el CaP, produciéndose pérdida de la arquitectura tisular normal, angiogénesis, atipia nuclear y alteraciones genéticas (76). Aunque no se ha demostrado claramente su papel en la iniciación tumoral, se ha sugerido que puede evidenciarse ya en la neoplasia intraepitelial, desplazando progresivamente al estroma normal (80). Así, este microambiente de estroma alterado inicia mecanismos que permitirían que un cáncer histológico escape de la inmunovigilancia o que un cáncer sensible a las hormonas escape del control hormonal, lo que conduciría a un cáncer independiente de andrógenos y a la progresión de la enfermedad, tanto en fases precoces como en neoplasias avanzadas (76).

Las interacciones entre epitelio y estroma en el microambiente tumoral prostático implican a muchos factores y hormonas además del RA. Las células estromales secretan factores de crecimiento de péptidos paracrinos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF), pudiendo estos factores difundirse desde el compartimento estromal hasta las células epiteliales, lo que influye en el crecimiento y diferenciación epiteliales (74). Además, las células cancerosas desencadenan una respuesta reactiva en el estroma liberando factores solubles como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estos factores pueden inducir la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en el estroma circundante asociado al cáncer, siendo capaces de inducir la transformación neoplásica en las células estromales del órgano huésped (76). Es así como las células del estroma son activadas por el tejido canceroso, mientras que el estroma reactivo dirige la carcinogénesis del epitelio prostático y la progresión del cáncer (76). La EMT impulsa el aumento de la migración celular, la invasión, y la producción de metástasis (81). Así, las células estromales y epiteliales sintetizan y responden a los factores de crecimiento de forma recíproca para desarrollar y mantener la función de la próstata, estando así este proceso de expresión de varios factores de crecimiento regulado por el RA expresado tanto en el compartimento epitelial como en el estromal (82). El epitelio prostático maligno puede influir en la expresión del RA estromal circundante, demostrando una pérdida de expresión de RA en células estromales asociadas con epitelio maligno. La sobreexpresión del RA epitelial maligno junto a la pérdida de reactividad del RA en el estroma periférico se ha asociado con alto grado y

PSA en el CaP, así como con una elevada tasa de recidiva tras prostatectomía radical (74), pudiendo reaparecer dicha expresión meses después del inicio de la castración (83).

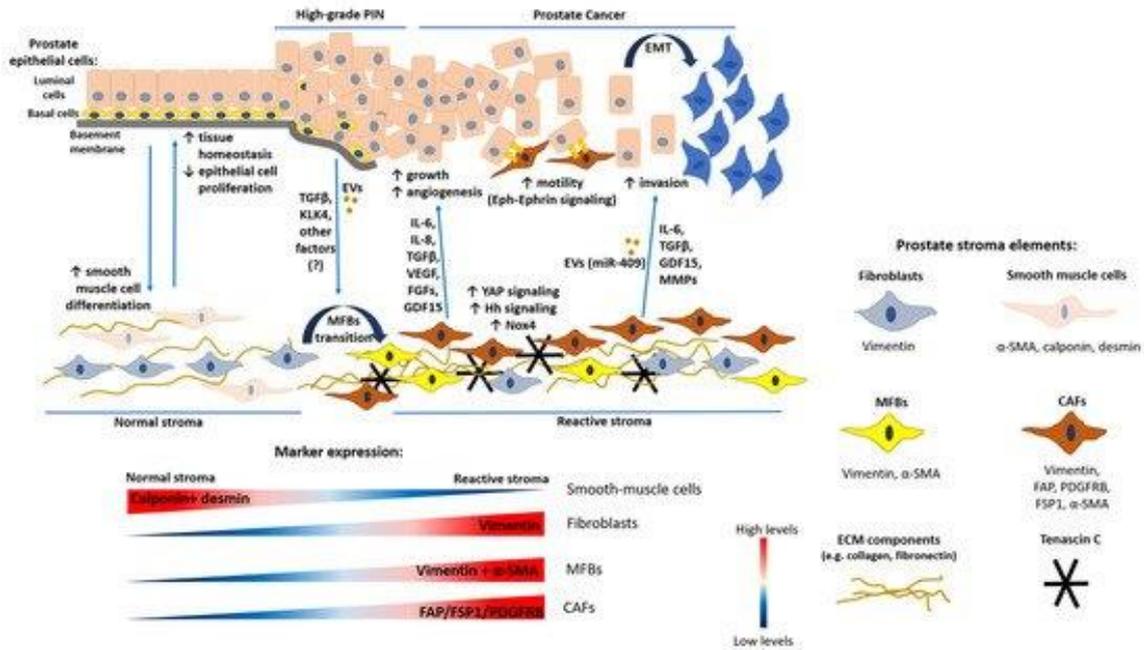


Figura 4. Interacción estroma-epitelio en la progresión del cáncer de próstata (84)

Recientemente, se han aislado y caracterizado una población especial de células estromales peritumorales en muestras procedentes de piezas de prostatectomía radical, que han denominado fibroblastos asociados a cáncer de próstata (CAF). En cultivos celulares se comportan de una manera similar a los fibroblastos normales, si bien resultan distintos a nivel citológico, presentando diversas características diferenciales (85). Las señales paracrinias del estroma mejoran la proliferación celular e inducen la tumorigénesis en el epitelio, y recíprocamente las células cancerosas secretan factores de crecimiento involucrados en la activación de fibroblastos (86). Los CAF inducen la proliferación maligna de las células epiteliales adyacentes promoviendo la carcinogénesis del tejido de HBP (85). Se han observado CAF en neoplasias intraepiteliales prostáticas premalignas y su número aumenta a medida que los tumores progresan a una enfermedad de grado superior (81). Los CAF alteran el microambiente tumoral a través del aumento de remodelación de las moléculas de la MEC, y los cambios en la formación de las fibras promueven la invasión y migración de las células tumorales y contribuyen a la progresión del cáncer (86). Los CAF tienen propiedades proangiogénicas e inmunomoduladoras en la carcinogénesis de próstata (87). Se sabe que los fibroblastos de diferentes zonas de la

próstata tienen una influencia diferente, no sólo en la carcinogénesis del CaP primario, sino también en el desarrollo metastásico, siendo así como los fibroblastos de las zonas periféricas y de transición, a diferencia de los de la zona central, alteran el perfil citogenético y estimulan la oncogenicidad de las células LNCaP. De esta forma, los fibroblastos periféricos y de la zona de transición promueven el crecimiento tumoral independiente de andrógenos de células LNCaP e incluso la formación de metástasis en ganglios linfáticos, huesos y pulmones (88). Con todo, el estroma reactivo es capaz de transformar una línea celular epitelial prostática no tumorogénica en una maligna (89), influyendo los CAF en la progresión tumoral, al incrementar la proliferación e invasión de líneas celulares de CaP *in vitro* y promoviendo la EMT (90).

En definitiva, parece que la investigación del estroma tumoral prostático es atractiva porque está presente en todos los carcinomas y porque su genoma resulta más estable que el de las células epiteliales (91). Los CAF son un componente clave del estroma tumoral que pueden ser aislados de muestras humanas para ser empleados en investigación básica, pudiendo ser una fuente de nuevos biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas en el CaP (85).

### **1.3 CULTIVOS DE CÉLULAS PROSTÁTICAS**

Las modernas técnicas de estudio molecular han permitido identificar multitud de procesos relevantes en la carcinogénesis y en la progresión de la enfermedad, así como diversos mecanismos que pueden alterar determinados genes claves como anomalías cromosómicas, mutaciones, translocaciones o hipermetilaciones (92) (93).

El conocimiento de los mecanismos moleculares y genéticos involucrados en la progresión del cáncer de próstata siguen siendo poco conocidos (94) en comparación con otros tumores como el cáncer de colon o mama (95). Un obstáculo para comprender los cambios genéticos moleculares en el CaP ha sido la dificultad para establecer lesiones premalignas y tumores de próstata primarios como cultivos celulares *in vitro* (94).

Los modelos de cultivo celular *in vitro* de muestras obtenidas de tumores humanos son esenciales para definir los mecanismos de iniciación y desarrollo del cáncer pudiendo así establecer estrategias diagnósticas y predictivas, así como regímenes terapéuticos específicos (95).

Históricamente, los cultivos *in vitro* de células prostáticas humanas se han limitado en disponibilidad y alcance en comparación con los de otros órganos (96). El

cultivo primario de células prostáticas de muestras quirúrgicas es un valioso modelo *in vitro* que puede ofrecer información sobre la regulación normal del crecimiento prostático y los cambios que ocurren durante la enfermedad. Sin embargo, las interacciones endocrinas y/o paracrinas complejas entre el epitelio y el estroma que pueden ser importantes para enfermedades prostáticas como el cáncer de próstata o la hiperplasia prostática benigna, no se estudian fácilmente *in vitro* (97). Los modelos de cultivo celular más comúnmente utilizados en la investigación del CaP corresponden a tres líneas celulares establecidas, PC3, DU-145 y LNCaP (96). Sin embargo, estos modelos son heterogéneos en su origen y todos derivan de lesiones metastásicas, no resultando adecuados para estudiar los fenómenos de progresión tumoral y no siendo representativos de los adenocarcinomas primarios (74). Asimismo, dado el tamaño de la próstata, su localización, la dificultad para obtener las muestras y la heterogeneidad de sus células, el cultivo celular realizado directamente sobre los especímenes prostáticos humanos resulta complejo (98).

En los últimos años, se han desarrollado varios modelos biológicos para mejorar la relevancia clínica de los modelos de cáncer *in vitro*, utilizando tejidos/células cancerosas clínicamente relevantes que representen mejor la heterogeneidad y complejidad de los cánceres e imitar el microambiente tumoral con mayor precisión (99).

El CaP es de naturaleza epitelial e implica interacciones complejas entre el estroma y el epitelio manteniendo un equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis (100). Las alteraciones en la interacción recíprocas entre las células epiteliales y el estroma circundante contribuyen a la progresión del CaP (86). El microambiente del tumor es esencial para el desarrollo y la progresión del CaP, junto con el conocimiento de los mecanismos de cómo las células estromales regulan las células epiteliales y las diferencias entre las células estromales prostáticas de diferente origen histológico/patológico en la progresión del CaP (100). Los esfuerzos para modelar las interacciones de las células estromales y epiteliales en cultivos *in vitro* han ayudado a descubrir la intercomunicación entre los tipos de células (74). Algunos estudios se han centrado en los eventos moleculares asociados con anomalías en las células epiteliales utilizando tejidos completos o células cultivadas (89). En los trabajos de co-cultivo *in vitro* se han producido resultados contradictorios de la regulación celular; así, algunas investigaciones demuestran cómo las células estromales primarias estimulaban el crecimiento de las células epiteliales normales y malignas, pero en otros estudios las células estromales inhibían el crecimiento epitelial (74).

Las células del estroma prostático cultivadas a partir de tejidos de diferentes orígenes histológicos y patológicos mostraron distintos perfiles de expresión génica. Muchos de los genes expresados diferencialmente están implicados en procesos biológicos que se sabe que son importantes en el desarrollo de enfermedades prostáticas, incluida la regulación de la proliferación y apoptosis celular, la adhesión celular y la respuesta inmunitaria (89).

En el estroma reactivo se encuentra un tipo de células estromales ya descritas previamente, los CAF que participan en la progresión y metástasis del CaP, modulando la inflamación, la angiogénesis y la proliferación de células del cáncer epitelial (100). Estos fibroblastos inducen la remodelación de la matriz proporcionando señales bioquímicas atípicas a las células epiteliales (86). En los cultivos es posible estudiar estas células de forma más adecuada, estableciendo así los cultivos celulares del estroma prostático (100).

En los últimos años, investigaciones recogen muestras de tejido prostático humano para cultivar los fibroblastos peritumorales, encontrando mayor expresión de diferentes factores que podría diferenciar procesos como HBP o en el CaP en diferentes áreas de la próstata (101). Dado que la variabilidad genómica de las células epiteliales es mucho más inestable en comparación con los fibroblastos estromales, el cultivo de los mismos supone una ventaja frente a los cultivos celulares de cáncer de próstata con células epiteliales (91).

No existen muchos estudios que hayan identificado rasgos diferenciales del estroma de pacientes con CaP en relación con tejido normal estudiando los fibroblastos tumorales cultivados. No obstante, en las publicaciones existentes, se afirma que los CAF cultivados tienen, por ejemplo, una afinidad mayor para anclarse al medio de agar que los fibroblastos cultivados de próstata humana normal (89). Adicionalmente, estudios que utilizan el método de recombinación de tejidos han demostrado que las células estromales procedente de la HBP muestran una capacidad de inducir el crecimiento de células epiteliales de HBP, mientras que la recombinación de células del estroma peritumoral, los fibroblatos tumorales con las células epiteliales no neoplásicas, producían tumores con un fenotipo más agresivo (97).

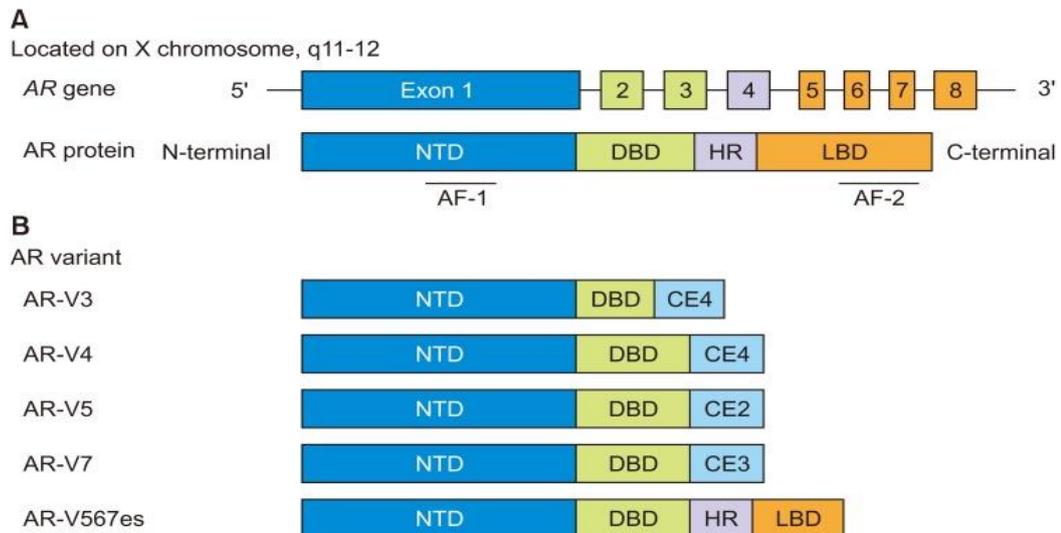
Varios trabajos han confirmado que las células estromales cultivadas en diferentes zonas de la próstata poseen programas transcripcionales diferentes, mostrándose completamente distintos los que proceden de la zona transicional, de las muestras obtenidas de HBP o de cáncer (89). Estudios recientes de co-cultivos de células epiteliales

de HBP con CAF demuestran como la presencia de los CAF aumenta la proliferación e invasión de las células epiteliales, asociándose así a la progresión tumoral y convirtiendo a las células epiteliales prostáticas benignas en un fenotipo más invasivo y proliferativo (86), lo cual no ocurría con fibroblastos prostáticos normales, constituyendo estos cocultivos con los CAF un modelo in vitro fiable para imitar las interacciones estroma y epitelio en el CaP (86).

Por todo esto, el empleo de CAF en cultivo puede favorecer la identificación de biomarcadores más fiables en el CaP que puedan servir como dianas terapéuticas en el futuro. Además, permite comprobar su comportamiento con células epiteliales procedentes de diversas líneas celulares empleando los modernos sistemas de co-cultivo para individualizar diferentes modelos de CaP a partir de tumores obtenidos de pacientes que sufren esta neoplasia (101).

#### **1.4 RECEPTOR ANDROGÉNICO**

El RA, clave en el CaP, es miembro de la superfamilia de receptores nucleares y tiene una estructura similar al receptor de estrógenos, el receptor de progesterona, el receptor de glucocorticoides y el receptor de hormona tiroidea. El gen RA se encuentra en el cromosoma X (Xq11-12) y consta de 8 exones que codifican aproximadamente 110 kDa de proteína. RA tiene cuatro regiones: desde el N-terminal, un dominio de transactivación N-terminal (NTD) codificado por el exón 1, un dominio de unión al ADN (DBD) codificado por los exones 2-3, una región bisagra codificada por el exón 4 y un dominio de unión (LBD) codificado por los exones 5-6. El NTD tiene repeticiones de glutamina (repeticiones CAG), y estas repeticiones de glutamina varían (la mayoría de los hombres tienen 19-25 repeticiones), lo que resulta en la variación de todos los aminoácidos en RA. El RA tiene aproximadamente 919 aminoácidos que se han registrado en la base de datos de mutaciones genéticas RA (102). Las repeticiones de glutamina más cortas están asociadas con una alta actividad transcripcional de RA (103). Los hombres con repeticiones de glutamina más cortas tienen un mayor riesgo de CaP (104).



**Figura 5: Estructura del RA.** (A) RA de longitud completa se compone de 8 exones. (B) Las variantes de corte y empalme RA se truncan en el dominio de unión al ADN (DBD) o en el dominio de unión al ligando (LBD). NTD: dominio N-terminal, HR: región bisagra, AF-1: función de activación-1, AF-2: función de activación-2, CE: exón crítico (102)

El RA tiene efectos importantes durante el transcurso de la vida de un hombre, que van desde el desarrollo en la pubertad hasta alteraciones en su regulación que conlleva a efectos como la calvicie o al desarrollo de patologías en la próstata como la HBP y el CaP (105).

En la próstata, la testosterona es biotransformada a dihidrotestosterona (DHT) en el estroma por la acción de la enzima 5-alfa reductasa, y transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial. En el citoplasma, los monómeros del RA están inactivos debido a que están unidos a proteínas llamadas chaperonas; estas chaperonas “secuestran” al RA e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional. Cuando la testosterona y la DHT se unen al LBD, es seguido del cambio conformacional de RA, las chaperonas se disocian y el RA es fosforilado; sólo así se transloca al núcleo, y es en el núcleo donde se produce la unión al ADN para facilitar la transcripción o no de los genes regulados por los andrógenos y posterior síntesis de las proteínas. El RA también interactúa con coactivadores (CoA) o factores de transcripción que ayudan a modular su actividad. La estabilidad del RA es mantenida por la fosforilación y se ha mostrado que el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), y la interleucina 6 (IL-6), participan aumentando la actividad del RA a través de la fosforilación del mismo receptor o de sus CoA (106).

La deprivación androgénica o bloqueo hormonal es el tratamiento de elección en la enfermedad metastásica, utilizándose también en la enfermedad localmente avanzada junto con radioterapia o de forma aislada en pacientes no candidatos a tratamiento radical,

así como tratamiento adyuvante en pacientes con recaída bioquímica tras tratamiento radical y sospecha de enfermedad a distancia. El tiempo medio en el que la mayoría de pacientes bajo deprivación androgénica evolucionaran a CPRC es de 2-3 años. No obstante, el CPRC no es un estado de hormonorrefractariedad; de hecho, el eje androgénico continua jugando un papel fundamental en la función y desarrollo del CPRC. Además, mientras otras vías de señalización pueden colaborar en el desarrollo y evolución del CPRC, el RA se mantiene como el principal mecanismo de desarrollo del CPRC, por lo que entender los mecanismos de resistencia que transforman al cáncer de próstata sensible a la castración (CPSC) en CPRC es fundamental para el desarrollo de futuras terapias.

El RA es el que facilita el paso de testosterona a DHT a nivel de la célula prostática. El crecimiento de la próstata es andrógeno dependiente. Las células prostáticas son muy sensibles a los andrógenos y regresan con la castración. El RA es actualmente la diana terapéutica del tratamiento del CaP. Los andrógenos esteroideos ejercen sus efectos mediante la unión al RA en el citoplasma y promueve la translocación nuclear. Una vez en el núcleo, promueve la transcripción de genes regulados por andrógenos que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Por ello, el tratamiento para el CaP localmente avanzado y metastásico se dirige al RA para la reducción de los niveles de andrógenos o mediante la inhibición de la activación del RA. Los andrógenos se suprimen por métodos quirúrgicos o químicos utilizando análogos de la hormona LHRH con o sin la adición de antiandrógenos. Inicialmente, los tumores de próstata mejoran en respuesta a la privación de andrógenos en hasta 80% de los casos (107). Sin embargo, algunos tumores comienzan a crecer progresando a metastásicos y ocasionando el fallecimiento del paciente en el plazo de 24-48 meses (108).

Se producen cambios del receptor de andrógenos en el CaP. Son varios los mecanismos que subyacen al desarrollo de CPRC:

1. Mutaciones puntuales en el receptor de andrógenos: El gen del RA es el que más muta de entre los receptores de esteroides reportándose hasta ahora más de 600 mutaciones. Las mutaciones en el RA pueden generar: 1) un receptor hipersensible; 2) una especificidad ampliada a otros ligandos no androgénicos; y 3) polimorfismos que modifiquen la respuesta al andrógeno, por ejemplo, las repeticiones de poli-glutaminas, poli-CAG. Estas mutaciones son raras en las etapas iniciales de la carcinogénesis pero aumentan en los tumores avanzados o en los recurrentes. Se encontraron mutaciones puntuales en el gen

RA en el 15% al 30% de los pacientes con CPRC (109), más frecuentemente en el LBD, seguido por el NTD (102). T878A fue la primera mutación puntual identificada de RA impulsada por flutamida, pero T878A también ejerce resistencia a los agonistas de AR de segunda generación (110). La mutación puntual F876L cambia el dominio LBD y confiere resistencia a la enzalutamida (111). Se encontraron mutaciones T878A o L702H en el plasma del 13% de los pacientes con CPRC con resistencia a la abiraterona (112). Estas mutaciones se pueden detectar en el ADN plasmático y pueden ayudar a los médicos a elegir los medicamentos apropiados para pacientes con CPRC (113).

2. La amplificación- hipersensibilidad del RA : La amplificación del gen RA se encontró entre el 30% y el 50% de los pacientes con CPRC, lo que resultó en la sobreexpresión de RA; es así como a diferencia de las células normales, las células que sobreexpresan el RA tienen la capacidad de responder a niveles muy bajos de andrógenos (114). Incluso bajo terapia de privación de andrógenos, todavía existen bajos niveles de andrógenos. La sobreexpresión de RA permite que el CaP progrese a niveles de castración de andrógenos. Las células de cáncer de próstata con amplificación RA pueden sobrevivir bajo terapia de privación de andrógenos, progresando a CPRC. La amplificación de RA fue más común en pacientes resistentes a enzalutamida que a abiraterona (110).
3. El aumento de la síntesis intracelular de andrógenos: En los hombres, aproximadamente el 80% de los andrógenos son producidos en los testículos, por lo que la castración quirúrgica, o la castración química con agonistas o antagonista de la hormona LHRH, disminuyen eficazmente el nivel de andrógenos circulantes. Sin embargo, los niveles de DHT intraprostática, mucho más potente que la testosterona, únicamente disminuyen en un 40%. Además, en el CPRC se sobreexpresan enzimas de la síntesis de andrógenos presentando un mayor nivel de andrógenos intratumorales que aquellos en situación de hormonosensibilidad por conversión de andrógenos adrenales y síntesis androgénica de novo. Estos andrógenos activarán el RA resultando en la progresión del CaP a pesar de una correcta castración (115).

4. Cambios en el cofactor del receptor de andrógenos en el cáncer de próstata: El coactivador RA interactúa directamente con RA y estimula la actividad transcripcional de la función RA. La formación de complejos coactivadores de RA mejora la apertura de la estructura de la cromatina en los sitios de unión a RA, lo que resulta en el reclutamiento de maquinaria transcripcional para atacar a los genes. En presencia de coactivadores el RA puede ejercer suficiente transcripción-actividad incluso a niveles muy bajos de andrógenos. La familia SRC es un grupo p160 que consta de tres correguladores evolutivos conservados de la transcripción: SRC-1 (NCOA [coactivador del receptor nuclear] -1), SRC-2 (NCOA-2) y SRC-3 (NCOA-3) (116). La expresión de SRC-1 está asociada con la agresividad del cáncer de próstata, y la supresión de la expresión de SRC-1 redujo el crecimiento y alteró la regulación del gen RA objetivo en las células de cáncer de próstata (117). El coactivador RA NCOA2, o SRC-2, se amplifica en el cáncer de próstata primario y metastásico. La privación de andrógenos induce NCOA2 que activa la señalización de PI3K y promueve la metástasis del cáncer de próstata y el desarrollo de CPRC (118). La expresión de SRC-3 aumenta en el cáncer de próstata avanzado, está elevado en CPRC y es necesario para el desarrollo de CPRC (119). Otro coactivador involucrado en la proliferación del cáncer de próstata es Tip60, que promueve la translocación de RA al núcleo (120). La proteína LIM cuatro y media (FHL2) es un coactivador que promueve la proliferación de células de cáncer de próstata. La desregulación del complejo FHL2-filamina promueve la activación constitutiva independiente del ligando de variantes de RA como la variante de corte y empalme del RA V7(AR-V7) (121).
5. Variantes del receptor de andrógenos: En comparación con el cáncer andrógeno-sensible, las variantes de corte y empalme del RA (ARVs) aumentan en el CPRC. Se han informado más de 20 variantes de RA, y la mayoría carecen de LBD (122). AR-V1 y AR-V7 fueron las variantes más abundantes en CPRC; estos ARV promueven la progresión del cáncer de próstata incluso sin ningún andrógeno (123). AR-V7 se encuentra en el núcleo bajo condiciones de deficiencia de andrógenos y es constitutivamente activo en genes que responden a los andrógenos. La expresión de las variantes RA

AR-V1 y AR-V7 aumentó en CPRC en comparación con metástasis óseas sin hormonas. AR-V567es se detectó en metástasis óseas CPRC, pero no en metástasis óseas sin hormonas. La expresión de AR-V567es y / o AR-V7 se asoció con una supervivencia deficiente (124).

Las terapias dirigidas como la terapia de privación de andrógenos, enzalutamida y abiraterona podrían inducir la expresión de AR-V7 en las células tumorales circulantes, mientras que la quimioterapia como docetaxel y cabazitaxel disminuyó la expresión de AR-V7 (125).

Estos cambios de AR-V7 en las células tumorales circulantes pueden reflejar las presiones selectivas sobre las células de cáncer de próstata por los tratamientos. La detección inmunohistoquímica de AR-V7 en el cáncer de próstata sin hormonas recién diagnosticado se asoció con una tasa de respuesta de PSA más baja por la terapia de privación de andrógenos y una supervivencia general más baja. La detección AR-V7 también fue un predictor significativo de progresión a CRPC en el cáncer de próstata sin hormonas (126).

Con todo, el RA desempeña funciones fundamentales en el CaP, especialmente en el desarrollo de CPRC y la adquisición de resistencia a la terapia dirigida por RA. Comprender los mecanismos de esta resistencia permitirá el desarrollo de terapias más eficaces para el tratamiento del CaP.

## **1.5 FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Los factores de crecimiento (FC) son hormonas peptídicas que regulan la proliferación celular por vías positivas o negativas e inducen una serie de respuestas en células blanco-específicas. La regulación de su síntesis, la modificación posterior a la traducción, el transporte, la presentación y la fijación a un receptor celular diana específico es un proceso de múltiples etapas que puede variar con cada tipo de FC. Los FC se activan por proteólisis y entonces son capaces de actuar en el interior de la célula (intracrina), o la propia célula que produce el FC es autoestimulada por él tras ser secretado y unirse con sus receptores específicos (autocrino) o estimular una célula cercana (paracrino). Otro modo de actuar es que el FC es producido por determinadas células del cuerpo que actúa sobre otras células distantes, transportado por el torrente sanguíneo (endocrino). Después de ser secretado, el FC puede ser secuestrado por fijación

a la MEC, pero cuando se libera se fija a receptores de FC específicos residentes sobre la membrana plasmática de la célula blanco (92).

Los FC se fijan a receptores específicos que son proteínas de transmembrana en donde la porción intracelular del receptor posee actividad enzimática que es activada por la unión del receptor al FC. El resultado de la fijación del receptor es la activación de enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas en tirosina, y que se las denomina quinasas de tirosina (TK). Las TK inician reacciones en cascada. Por lo general, la unión entre receptor y ligando lleva a la autofosforilación y activación de la enzima receptora. El receptor activado se une a proteínas citoplasmáticas que inician una cascada que culmina con la fosforilación de proteínas como las quinasas del grupo proteincinasa activada por mitógeno (MAPK), que a su vez fosforilan factores de transcripción cuya activación determina que se modifique la expresión de ciertos genes, última etapa de la serie de reacciones (92) (127).

Los FC comunes de la próstata (128) y otros tejidos son:

- Factores de crecimiento de fibroblastos
- Factor de crecimiento epidérmico
- Factor de crecimiento transformante
- Factor de crecimiento insulínico
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas

### **1.5.1 Familia de los factores de crecimiento de fibroblastos**

La próstata está compuesta por compartimentos epiteliales y estromales que están separados por membranas basales (129). El epitelio tiene tres tipos de células principales: células luminales, células basales y células neuroendocrinas (130). Las células luminales expresan las citoqueratinas 8 y 18, el marcador de superficie celular CD57 y el RA. Son células diferenciadas terminalmente que producen proteínas secretoras prostáticas de una manera dependiente de andrógenos. La retirada de andrógenos induce una apoptosis masiva en las células luminales. Las células basales, que expresan las citoqueratinas 5 y 14, CD44 y P63, residen entre las células luminales y las membranas basales. Aunque algunas células basales expresan débilmente el RA, muchas de ellas son RA negativas y no dependen de los andrógenos. Las células neuroendocrinas, que son una población celular menor en el compartimento epitelial, expresan sinaptofisina, cromogranina A y proteína de vesícula sináptica (131). El estroma de la próstata es un tejido fibromuscular

compuesto de células similares al músculo liso (SMC) que expresan  $\alpha$ -actina y células similares a fibroblastos que no expresan  $\alpha$ -actina. Aunque las células en los dos compartimentos están separadas por las membranas basales, mantienen comunicaciones reguladoras bidireccionales activas mediadas por factores de crecimiento paracrinos. El eje de señalización del FGF es un mecanismo regulador importante en la próstata, requerido para el desarrollo, la homeostasis de los tejidos y la función de la próstata. La testosterona controla la señalización de FGF específica de la dirección entre el estroma y el epitelio, lo que mantiene la homeostasis de tejido prostático. Las mutaciones, las ablaciones, y las activaciones anormales de los componentes del eje de señalización de FGF, son patológicas y contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer. La interrupción de estas comunicaciones reguladoras bidireccionales que promueven la homeostasis es una característica común en CaP.

Los FGF se pueden aislar de muchos tejidos y provienen de células de origen embrionario mesodérmico o neuroectodérmico. También se pueden hallar en una amplia variedad de tumores y son producidos por muchas células en cultivo. En 1979, Jacob y col. identificaron un FC prostático del que pudieron demostrar que era un factor mitogénico presente en extractos prostáticos humanos. Todos estos primeros FC son analizados ahora como miembros específicos de la familia FGF (92).

En la actualidad, se han caracterizado al menos 22 miembros de la familia FGF. Los FGF se expresan en casi todos los tejidos y juegan papeles importantes en una variedad de procesos normales y patológicos que incluyen el desarrollo, la cicatrización de heridas y la transformación neoplásica. Los FGF son mitogénicos para muchos tipos de células, tanto epiteliales como mesenquimales. Algunos FGF, como FGF-2, tienen una potente actividad angiogénica y han sido implicados como promotores de la angiogénesis tumoral. También se ha demostrado que los FGF aumentan la motilidad y la invasividad de una variedad de tipos de células. Finalmente, se ha demostrado que los FGF pueden inhibir la muerte celular en el contexto apropiado. Por lo tanto, los FGF tienen una amplia gama de actividades biológicas que pueden desempeñar un papel importante en la tumorigénesis (132).

Los FGF se pueden clasificar en tres subfamilias (FGF intacrinos, paracrinos y endocrinos) según su mecanismo de acción. Los FGF intacrinos no son típicos y no se unen al receptor del FGF (FGFR). Su función no está mediada por un receptor. Los FGF paracrinos consisten en 15 miembros y ejercen su función biológica mediante la unión a un dominio extracelular de FGFR con heparina/heparán sulfato y activando la

señalización de tirosina quinasa de los FGFR. Los FGF endocrinos tienen baja afinidad por la heparina/heparán sulfato en contraste con los FGF paracrinos (133).

Existen dos tipos de receptores que se caracterizan por su distinta afinidad con el FGF en la superficie celular: receptores de alta afinidad y receptores de baja afinidad. Los receptores de alta afinidad de los FGFR son proteínas transmembranas con actividad tirosin quinasa. Los FGF interactúan con una familia de cuatro receptores distintos de tirosina quinasa de alta afinidad, designados como FGFR 1-4. Los receptores consisten en una porción extracelular que contiene tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) (I-III), un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular dividido. FGFR 1-3 tienen dos tipos de dominios III de tipo Ig, IIIb y IIIc, que se generan mediante un empalme alternativo; así, el dominio de tipo Ig es crucial para determinar la especificidad de unión a ligando (134). La familia de los FGF y de sus receptores presentan doble redundancia debido a su complejidad, porque un mismo factor se puede unir a distintos receptores, y un mismo receptor puede ser activado por diferentes FGF (135). Los receptores de baja afinidad de los FGF son los glucosaminoglicanos de proteoglicanos heparan-sulfatados (HSPG) expuestos en la superficie de la célula y presentes en la matriz mitocondrial (136). En 1992 se demostró que el 5 % del FGF localizado en la matriz extracelular está unido a HSPGs, fijados a la membrana celular (137). También se había observado que la unión del FGF a su receptor de alta afinidad requería HSPG (136). Todo esto implica que la unión de los FGFs al receptor es muy compleja y parece comprometer a más de un receptor en la célula diana.

Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de los FGFs es su unión a la matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta por proteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Esta estructura no solo proporciona la base sobre la que se realiza la proliferación y diferenciación de las células si no que, además posee una función importante en la regulación de estos procesos. Los mecanismos autocrino y paracrino de los FGF hacen posible la comunicación intercelular, proporcionando un nuevo sistema de información celular y facilitando la adhesión celular a la matriz extracelular (138). El heparan sulfato de la matriz extracelular que se une al FGF potencia y alarga la actividad del FGF (139), facilitando su unión a los receptores específicos, proporcionando protección frente a la proteólisis y almacenándolo unido a la membrana para su posterior liberación. La mayor movilización de FGF de la matriz extracelular en los tejidos cancerosos puede aumentar la disponibilidad de FGF para las células cancerosas.

Las células epiteliales del cáncer de próstata expresan los cuatro tipos de receptores de FGF (FGFR-1 a -4) a frecuencias variables. La expresión de FGFR-1 y FGFR-4 está más estrechamente relacionada con la progresión del cáncer de próstata, mientras que el papel de FGFR-2 sigue siendo controvertido. La activación de los receptores de FGF puede activar múltiples vías de transducción de señales, incluida la fosfolipasa C $\gamma$ , fosfatidil inositol 3-quinasa, proteína quinasa activada por mitógeno y transductores de señal y activadores de las vías de transcripción, todos los cuales juegan un papel en la progresión del CaP. Los efectos del aumento de la señalización del receptor de FGF son muy diversos e involucran tanto a las células cancerosas como al estroma circundante, incluida la vasculatura. El resultado neto del aumento de la señalización de FGF incluye una mayor proliferación, resistencia a la muerte celular, mayor motilidad e invasividad, mayor angiogénesis, mayor metástasis, resistencia a la quimioterapia y a la radiación, y la independencia de andrógenos, todo lo cual puede mejorar la progresión tumoral y la agresividad clínica. Por esta razón, el sistema de señalización de FGF es un objetivo terapéutico atractivo, particularmente porque las terapias dirigidas a los receptores de FGF y/o la señalización de FGF pueden afectar tanto a las células tumorales directamente como a la angiogénesis tumoral. Actualmente se están desarrollando varios enfoques que podrían apuntar a los receptores de FGF y/o la señalización de los receptores de FGF en el cáncer de próstata (132).

De esta manera, la expresión alterada de los FC y sus receptores pueden desempeñar un papel clave en el establecimiento y la progresión del CaP, actuando por los mecanismos descritos (autocrinos o paracrinos) para estimular la proliferación tumoral y/o prevenir la apoptosis, mejorar la invasión, promover la angiogénesis, y posiblemente la metástasis (140).

Las células estromales aumentan la secreción de factores de crecimiento, que a su vez incrementan la proliferación de células epiteliales prostáticas (141).

Por todo ello, debemos entender los FC como un lenguaje de comunicación en el microambiente celular. En la próstata, específicamente en el estroma, el complejo RA-DHT activa la secreción de los FC que cruzan la membrana basal hacia el comportamiento epitelial. Activa el gen andrógeno dependiente aún sin andrógenos convirtiéndose así en una vía de insensibilidad a los mismos (142).

### **1.5.1.1 Factor de crecimiento de fibroblastos 2**

El Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) o el FGF básico (FGFb) pertenece a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos, constituyendo el factor de crecimiento principal extraído del tejido prostático que se sintetiza principalmente por fibroblastos estromales.

El FGFb o FGF-2 se purificó de la glándula pituitaria por Gospodarowicz en 1975. Fue la primera molécula que se purificó y mostraba un punto isoeléctrico básico (143). El genoma humano tiene solo una copia del gen FGF-2 que se encuentra situado en el cromosoma 4q26-27 (144). El gen tiene un tamaño de 40 KDa y está constituido por tres exones que se interrumpen por dos intrones (145). Se han descrito varias isoformas del FGF-2 con pesos moleculares que varían entre 18 a 25 KDa. La distribución de la forma de 18 KDa es citosólica, mientras que las de entre 22 a 25 KDa se encuentran en el núcleo y estimulan el crecimiento celular (146).

La unión del FGF-2 a los heparansulfatos presentes en las membranas celulares y en la MEC favorece sus acciones biológicas proporcionando un reservorio de estos factores de crecimiento y protegerlos de la degradación para luego prepararlos para la presentación a los receptores incluso aumentando la afinidad de FGF-2 por su receptor (92).

El FGF-2 se une a receptores con gran afinidad en las células teniendo relación con FGFR1, FGFR2 y FGFR3. En particular, en el caso de FGFR2 si utiliza el exón III c se produce un receptor por gran afinidad por FGF-2. La unión de FGF-2 a estos dominios de Ig extracelulares activa el dominio transmembrana y los intracelulares de tirosina quinasa de los receptores de FGF-2 produciendo la dimerización, autofosforilación y activando la cascada ras y finalmente la transcripción del gen FGF-2 (147). Para que el FGF-2 funcione de forma paracrina, debe secretarse extracelularmente desde la célula en el que se sintetiza a través de la lisis celular o daño de la membrana plasmática (148).

Numerosos activadores de la angiogénesis, como el FGF-2, son secuestrados en la MEC, unidos al sulfato de heparina, la degradación de la matriz por proteasas derivadas del tumor libera estos factores que estimulan la proliferación celular (92).

El FGF-2 es un factor angiogénico que induce la proliferación, migración del endotelio, la diferenciación de las células endoteliales, y la formación de una microvasculatura diferenciada (149). La migración inducida por FGF-2 y la proliferación celular se diferencian en nuevas estructuras vasculares (149). Durante la angiogénesis, el FGF-2 regula la actividad de moléculas de la MEC, como colagenasas, proteinasas,

activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) e integrinas de la superficie celular (150). El FGF-2 estimula en las células endoteliales la secreción de uPA y colagenasa, produce degradación de la membrana basal, y estimula la migración en la angiogénesis modulando la capacidad de invasión de las células tumorales (151). El aumento de FGF-2 sería consecuencia de la degradación de la MEC por el tumor y con la liberación de este potente factor angiogénico cubre las necesidades básicas de un tumor en vías de crecimiento (92).

Muchos estudios han indicado que la aparición de la actividad angiogénica es un evento temprano en el proceso de transformación maligna de células normales, y existe una estrecha correlación entre la angiogénesis y la progresión maligna. Folkman et al. propusieron una hipótesis de que los tumores son angiogénicos dependientes, y que un tumor no pudo crecer más allá de 3 mm sin angiogénesis (152).

FGF-2 induce la diferenciación, crecimiento y la invasión de células tumorales y se expresa en tumores urológicos humanos y líneas celulares tumorales que incluyen próstata, vejiga, riñón y otros tipos (153). FGF-2 estimula la angiogénesis tumoral y provoca el crecimiento de células cancerosas. La invasión de células tumorales a través del tejido circundante está modulada por uPA y proteinasas producidas por la estimulación de FGF-2 (154). En la angiogénesis tumoral, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimula en las células endoteliales la producción del FGF-2, que mejora aún más la actividad angiogénica a través de mecanismos autocrinos y mecanismos intracrinos (155).

El FGF-2 es un importante mitógeno para las células del estroma de la próstata en donde se fabrica, mientras que solo es un mitógeno débil para las células epiteliales de la próstata (92). En la próstata madura, después de lograr el máximo crecimiento normal, las células del estroma prostático son el objetivo y mediador de los efectos androgénicos. Por lo tanto, la hipertrofia de próstata (HP) puede ser resultado del crecimiento de células epiteliales prostáticas regulado por andrógenos indirectamente a través de los andrógenos dependientes mediador de células del estroma (156). El tejido diana principal del FGF-2 es el mismo estroma (autocrino) (157). La expresión de ARNm de FGF-2 se ha informado en el estroma en la HP. En estudios de cultivo celular, el FGF-2 estimula el crecimiento de células epiteliales prostáticas que indica el potencial de efectos paracrinos in vivo; así, el FGF-2 puede tener su mayor efecto sobre la próstata del adulto ante la estimulación con andrógenos (158). Los fibroblastos del estroma prostático responden a la estimulación con andrógenos a través de su receptor de andrógenos, y los andrógenos

potencian los efectos del FGF-2 (159). Estudios indican que el FGF-2 es uno de los mediadores de crecimiento inducido por andrógenos en la próstata humana (159).

El FGF-2 tiene una función oncogénica en la próstata. FGF-2 y sus receptores, FGFR1, R2 y R3, están presentes en el estroma prostático y las células epiteliales en cultivos celulares. FGF-2 es producido principalmente por los fibroblastos estromales y estimula su crecimiento de forma autocrina. FGF-2 también es producido por células del carcinoma primario de próstata con metástasis y metastásico independiente de andrógenos (160). El FGF-2 se expresa en las células del estroma peritumoral conduciendo a una mayor proliferación e invasión en el CaP (140).

El papel de FGF-2 en el desarrollo de malignidad ha quedado demostrado. Tanto en el suero humano como en orina, se ha detectado el FGF-2, encontrando un aumento en la concentración de FGF-2 en neoplasias malignas (161).

Los cánceres de próstata ocultos pueden proliferar y diferenciarse en cánceres de mayor grado bajo la influencia de inductores angiogénicos, incluido FGF-2 (152).

Un papel importante de FGF-2 está en la diferenciación de las células de CaP desde un fenotipo latente a uno invasivo que ha sido documentado. Yan et al. informaron de la progresión a un fenotipo invasivo en las células CaP de rata que mostró actividad regulada por el gen FGF-2 (162).

Por todo ello, el FGF-2 se ha relacionado con la iniciación y progresión del cáncer de próstata a través de actividades autocrinas y paracrinas. El FGF-2 induce en las células endoteliales la síntesis de uPA, favoreciendo así la degradación de la MEC. Se ha observado que diversas líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3 sintetizan cantidades variables de FGF-2 y expresan también su receptor. En las líneas celulares DU145 y PC3 el aumento de uPA se ha correlacionado con fenotipos más agresivos (163). Este hallazgo indica la estrecha relación entre FGF-2 y la progresión del CaP. Por el contrario, la expresión elevada de FGF-2 no causa la progresión del CaP en las células LNCaP (164).

Las células DU145 independientes de andrógenos producen una mayor cantidad de ARNm de FGF-2 y expresa una gran cantidad de receptor FGF-2. Las células PC3 también sintetizan un alto nivel de ARNm de FGF-2, aunque menor que el producido por DU145 (160).

El FGF-2 puede aumentar la supervivencia de las células endoteliales radiadas, lo que podría limitar la efectividad de la radioterapia para inhibir la angiogénesis tumoral; así, una mayor expresión de FGF-2 podría contribuir a la resistencia de muchos cánceres

a la radiación y/o quimioterapia (165). Es así como se ha relacionado a FGF-2 con la progresión del cáncer de próstata, por lo que el bloqueo de los receptores de FGF-2 podría controlar la progresión del tumor (163).

Dos patrones distintos y alterados aparecen en la expresión del gen FGF-2: la etapa no invasiva de las células tumorales que muestra la falta de expresión del gen FGF-2; y las células invasoras de CaP que demuestran un alto nivel de la expresión del gen FGF-2. En la transición de los fenotipos latentes a los activos, las células CaP también demuestran la aparición de un aumento de la expresión del FGF-2 (160).

En resumen, existe evidencia que el FGF-2 puede sobreexpresarse en el CaP y tal sobreexpresión altera las propiedades de las células epiteliales prostáticas aumentando la proliferación tumoral, la angiogénesis y posiblemente las metástasis (140). La expresión de FGF-2 del estroma se puede asociar con una etapa clínica en el CaP más alta y una mayor tasa de recurrencia bioquímica. Es importante señalar el impacto del estroma tumoral en la progresión maligna haciendo de esto la necesidad de una mayor exploración de los componentes del estroma tumoral como objetivos terapéuticos en el CaP (166).

#### **1.5.1.2 Factor de crecimiento de fibroblastos 7**

El factor de crecimiento de fibroblastos 7 o factor de crecimiento de queratinocitos (FGF-7, KGF) es un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos que se encuentra en los tejidos de mamíferos adultos (128). Es un péptido con un peso molecular de 18 KDa, y el gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma humano 15q21.1 (92).

El FGF-7 o KGF es producido por las células estromales actuando por vía paracrina sobre epitelios tales como epidermis, neumocitos tipo II, alveolos mamarios y recubrimiento del tracto gastrointestinal. Su receptor se forma por el procesamiento del ARNm del FGFR-2 (128).

FGF-7 se ha detectado en tejido estromal embrionario y adulto, lo que sugiere un papel en las interacciones epitelio-mesenquimatosas durante el desarrollo y la homeostasis del tejido normal. Sintetizado por fibroblastos en tejidos normales, actúa como un potente mitógeno en las células epiteliales (167). Se trata de un factor de crecimiento de unión a heparina que actúa a través de la interacción con el receptor tirosina quinasa FGFR2IIIb específico de FGF-7 en células epiteliales (168). La unión de FGF-7 fuerza la dimerización de FGFR2, desencadenando varias vías de transducción de

señales, incluida la MAPK, y las vías de señalización PI3K que desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral (169).

Muchos estudios muestran que FGF -7 contribuye a la reepitelización de los tejidos dañados durante la cicatrización, teniendo un papel importante en la reparación de tejidos y se expresa altamente en queratinocitos (168). Su expresión aumenta en la enfermedad inflamatoria intestinal, también se ha propuesto como posible marcador tumoral, y protege a las células epiteliales de la toxicidad de los derivados reactivos del oxígeno (170). Es un potente mitógeno para las células desencadenando hiperplasia de neumocitos tipo II, de las células de los conductos pancreáticos, del epitelio gastrointestinal y de la glándula mamaria (128).

FGF-7 se ha implicado en la tumorigénesis de varios cánceres. Se observa la coexpresión de FGF-7 y FGFR2 en cánceres gástrico, colon y pancreático, así como en adenocarcinomas de pulmón, donde se asocia con mal pronóstico (169). En el cáncer de páncreas, FGF-7 tiene un papel esencial en el crecimiento de células epiteliales y se sobreexpresa cambiando la estimulación paracrina a autocrina (168). Además, se han descrito pruebas de la función del FGF-7 en la tumorigénesis en el cáncer de mama, donde se sobreexpresa en el 30% de los casos (167).

Existen varios factores que tienen la capacidad de estimular la expresión del FGF-7 en las células estromales. Diversos estudios demuestran que citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, y especialmente la interleucina 1 (IL-1), aumentan la transcripción y la síntesis proteica de FGF-7 en fibroblastos (168). En la próstata, el FGF-7 es un mitógeno potente para las células epiteliales prostáticas, mientras que no es mitógeno para las células del estroma de la próstata, donde es sintetizado (92). Es producido en las células del estroma prostático constituyendo el mayor candidato a ser el eje mediador entre el estroma prostático y el epitelio glandular, teniendo la interacción epitelial-estromal un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en el tejido prostático normal (92). La variante del receptor FGFR2 el FGFR2IIIb es específico de FGF-7, contribuyendo la unión FGF-7-FGFR2IIIb a la interacción epitelial-estromal (133).

En la próstata normal, el FGF-7 actúa como factor de crecimiento paracrino sintetizado en las células estromales que actúa sobre las células epiteliales a través de su receptor (171). El FGF-7 está presente en aproximadamente 28 ng/g de peso húmedo en la próstata normal y contiene un péptido señal clásico secretándose activamente (132).

El papel de FGF-7 en el crecimiento anormal de la próstata es incierto; el FGF -7 puede exhibir su mayor función en la próstata durante el desarrollo. En la HBP algunos estudios han demostrado que el FGF-2 y el FGF-7 se sobreexpresan en los tejidos de HP (92). Diversos autores han encontrado un aumento de la expresión de FGF-7 en pacientes con HBP respecto a la del tejido normal, concluyendo que la sobreexpresión de FGF-7 y FGF-2 juegan un importante papel en la proliferación celular anormal que tiene lugar en la HBP y observan como el FGF-7 es un importante mitógeno epitelial en las células en cultivo. Un análisis cuantitativo de la proliferación celular por la inmunohistoquímica Ki67 reveló una fuerte correlación de la proliferación epitelial con el contenido de FGF-7 en el tejido de HBP, demostrando así su importante papel en la proliferación epitelial anormal (172).

Parece cada vez más claro que las señales androgénicas darán lugar finalmente a HBP a través de la modulación de diferentes factores de crecimiento como el FGF-7, el IGF o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (132). Diferentes investigaciones señalan que las células estromales de pacientes con HBP contienen niveles elevados de FGF-7 asociados con una expresión del RA superior a la normal, estando nuestro factor involucrado en la patogénesis y en el mantenimiento de la HBP pudiendo estar su secreción regulada por el RA (173).

En el CaP, el patrón de expresión de FGFR es diferente en cada línea celular de CaP. La expresión de FGFR2IIIb es indetectable en células PC3 que muestran un crecimiento independiente de andrógenos y un alto potencial de proliferación celular. Por otro lado, la expresión de FGFR2IIIb es detectable en células LNCaP que muestran la expresión del receptor de andrógenos, el crecimiento dependiente de andrógenos, y un potencial relativamente bajo de proliferación celular (133). Así, el crecimiento celular y las características proliferativas de las células LNCaP están moduladas por el FGF-7 estimulando significativamente la proliferación de células LNCaP (174).

Diversos estudios muestran en múltiples modelos de ratones transgénicos que la sobreexpresión de varios factores de crecimiento, entre ellos el FGF-7 en las células epiteliales de la próstata, conducen a lesiones prostáticas que van desde PIN de bajo grado, PIN de alto grado y CaP (129).

No son muchos los estudios publicados sobre el FGF-7 en cáncer de próstata, pero se cree que es uno de los factores de crecimiento más importantes en el control de la homeostasis de la próstata junto con los andrógenos. Se demuestra que la expresión del ARNm de FGF-7 es estimulada por andrógenos en las células del estroma prostático, pero

no en las células epiteliales. Cuando existe una activación aberrante de las vías de los FGF, aparece una progresión de CaP (167). FGF-7 es expresado en niveles elevados por las células estromales en el tejido de CaP y funciona como factor autocrino/paracrino, interactuando el FGF-7 con andrógenos o RA en la próstata, habiéndose encontrado sobreexpresados en los carcinomas prostáticos (76). Es entonces que se puede decir que como el FGF-7 se expresa en células epiteliales de HBP y en CaP, se ha sugerido que podría actuar como un factor autocrino en HBP y CaP (171).

En el CaP localizado, algunos autores señalan que el FGF-7 se encuentra altamente expresado en los CAF (101). Sin embargo, otros autores no encuentran una mayor expresión de FGF-7 en cánceres de próstata clínicamente localizados, lo que contrasta con otros informes que señalan un aumento de ARNm de FGF-7 en células de cáncer de próstata. Es necesario decir, sin embargo, que FGF-7 es un potente factor de crecimiento para las células epiteliales prostáticas y está presente en concentraciones significativas en los tejidos cancerosos contribuyendo al crecimiento de las células cancerosas (140).

Se ha publicado una sobreexpresión de FGF-7 en tumores insensibles a hormonas, no encontrando asociación del grado y el estadio tumoral con la expresión de FGF-7. En el CPRC, ciertas investigaciones señalan el desarrollo de CPRC y el papel que tiene el FGF-7 para permitir que estas células sobrevivan, y se han encontrado resultados que indican que el desarrollo de CPRC puede deberse a que el FGF-7 permite la supervivencia de las células en presencia de un entorno castrado (175).

La pérdida de las isoformas de FGFR2 se muestra en tejidos humanos de CaP y la pérdida de FGFR2IIIb se asocia con las características del cáncer de próstata resistente a la castración (133).

Con todo ello, parece demostrada la importancia de FGF-7 en la génesis del CaP que podría tener un papel específico en el desencadenamiento de la invasión de células epiteliales prostáticas humanas, aclarando así su función oncogénica en la progresión e invasión celular en el CaP (167).

### **1.5.1.3 Factor de crecimiento de fibroblastos 10**

El factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10) o factor de crecimiento de queratinocitos 2, junto con FGF-3, FGF-7 y FGF-22, forman la subfamilia FGF-7 de ligandos paracrinos (176). El gen FGF-10 se sitúa en el locus 5p12-p13 del cromosoma 5 y codifica una proteína de 208 aminoácidos con un peso molecular de 19 KDa (177).

El FGF-10 es un nuevo miembro de la familia FGF sintetizado principalmente por células mesenquimales y actúa predominantemente sobre las células epiteliales de manera paracrina. (178). Glicoproteína secretada cuyos efectos se aplican a través de dos receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, incluidos FGFR1b y FGFR2b, con baja y alta afinidad, respectivamente (177). Así, los ensayos han demostrado que FGF-10 activa FGFR1b más débilmente que FGFR2b (179) ; sus acciones dependen de su unión a la isoforma IIIb del receptor 2 de FGF de la superficie celular (FGFR2IIIb) con heparina /heparán sulfato (178). La unión de FGF-10 al FGFR2-IIIb da como resultado vías de transducción de señales que promueven la proliferación epitelial, la motilidad y la supervivencia (176).

Este factor de crecimiento es un mitógeno derivado de las células mesenquimales y se unen a las células epiteliales generando señalización mesenquimal a epitelial; así, el FGF-10 se expresa en el mesénquima ejerciendo, como dijimos, su influencia en modo paracrino en el epitelio. Las vías de señalización de FGF-10 son entre otras las vías PI3K-AKT y Ras / MAPK. La vía de señalización PI3K-AKT ajusta la supervivencia celular mientras que la vía de señalización Ras / MAPK regula la proliferación y diferenciación celular (177).

Se sabe que el FGF-10 desempeña un papel importante en el desarrollo de varios órganos como corazón, hígado, estómago, cerebro, riñón, oído interno, lengua, ojos, páncreas, glándula mamaria, glándula salival, tiroides, pulmones, próstata, y extremidades fetales (177); contribuye a la cicatrización de heridas en la piel, reparación de tejidos promoviendo la migración y proliferación celular (179), y el crecimiento de células epiteliales prostáticas (178). El FGF-10 es el más eficaz en la cicatrización de heridas en comparación con otros factores de crecimiento como FGF-7 y TGF- $\beta$ , examinados en la formación de cicatrices (177). Las mutaciones del gen que codifica FGF-10 en humanos están relacionadas con la aplasia de las glándulas lacrimales y salivales y el síndrome lacrimo-auriculo-dento-digital (179).

FGF-10 desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la reparación del urotelio, proceso que ocurre a través de una cascada paracrina que se origina en el mesénquima (lámina propia) y se dirige al epitelio (urotelio). Durante las fases proliferativas, los niveles de FGF-10 aumentan desempeñando un papel fundamental en la respuesta urotelial a una lesión secundaria a infección, traumatismo, obstrucción del tracto urinario e isquemia. La manipulación de la

respuesta urotelial a través de estos factores de crecimiento puede reducir la formación de cicatrices o acelerar la erradicación de la infección (180).

La señalización aberrante de FGF-10 a través de FGFR2b y en ocasiones de FGFR1b contribuye a progresión en varios cánceres humanos. El desarrollo de herramientas farmacológicas selectivas de isoformas aclarará el papel de la señalización de FGF10-FGFR2b / 1b en diferentes tipos de cáncer y permitirá explorar el potencial de FGF-10 como diana terapéutica (179).

El FGF-10 tiene un papel importante en la proliferación de células cancerosas al mejorar la transición de la fase G1 a la S, y así preparar las células para la mitosis (177). En tejidos colorrectales normales no se detectó ARNm de FGF-10; en contraste, se observó ARNm de FGF-10 en células de cáncer colorrectal y fibroblastos adyacentes a células cancerosas, mostrando la expresión de FGFR2IIIb en células de adenocarcinoma colorrectal, contribuyendo FGF-10 al crecimiento de estas células de adenocarcinoma colorrectal (178). En el cáncer de estómago los niveles de FGF-10 se correlacionan con un mal pronóstico de adenocarcinoma gástrico (179). FGF-10 induce migración e invasión en células de cáncer de páncreas (177), encontrando su expresión estromal elevada junto con una expresión alta de FGFR2IIIb en células cancerosas que se ha correlacionado con un mal pronóstico (179). La sobreexpresión de FGF-10 estimula la formación de tumores de células epiteliales en el pulmón (177) causando adenomas pulmonares multifocales (179). Entre las funciones de FGF-10 ya señalamos cómo la elevación de este marcador se asocia a una curación eficaz de las lesiones cutáneas; sin embargo, la elevación sostenida de FGF-10 también se ha implicado en el carcinoma cutáneo de células escamosas (179). El FGF-10 se encuentra incrementado en tumores de mama humanos (177). El FGF-10 desempeña también un papel fundamental en otros cánceres, pudiendo estar involucrados en la carcinogénesis de los tumores uroteliales (180).

El FGF-10 es un factor significativo durante la transición epitelial-mesenquimal esencial en el cáncer y en la metástasis. La EMT es un proceso en el que las células epiteliales pierden sus conexiones, adquiriendo capacidad de migración y mejorando la invasión de las células tumorales. El FGF-10 puede estimular la EMT a través de diferentes vías de señalización como las que describimos previamente. La expresión de FGF-10 reduce la expresión génica de E-cadherina (responsable de las conexiones de adherencia epitelial), aumentando así la capacidad de invasión de las células tumorales,

teniendo el nivel de expresión de E-cadherina una correlación inversa con el grado y el estadio del tumor (177).

El FGF-10, un factor homólogo del FGF-7, se expresa con niveles elevados en la próstata de la rata, tumores de próstata de rata bien diferenciados con un compartimento epitelial y estromal, y en células del estroma prostático derivadas en cultivo (181), y tiene una expresión específica en las células del estroma de origen muscular liso (92). El FGF-10 de rata es un mitógeno específico para las células epiteliales de la próstata (181).

En la próstata humana, el FGF-10, que es expresado por las células del estroma, está presente en niveles bajos en la próstata adulta normal y probablemente no actúa como un factor de crecimiento significativo en este contexto, aunque es importante para el desarrollo prostático (132). Curiosamente, se requiere FGF-10, pero no FGF-7, para el desarrollo de la próstata prenatal y adolescente, la ablación de los alelos *Fgf10* interrumpe el desarrollo prenatal de la próstata y la respuesta a los andrógenos (129).

Algunos trabajos describen la importancia de FGF-10 en el desarrollo prostático, no teniendo un importante papel en el desarrollo de HBP y de la próstata adulta puesto que sus valores son extremadamente bajos si los comparamos con FGF-7 (182). Otros estudios encuentran transcripciones de FGF-10 en estroma derivado de muestras de hiperplasia prostática humana benigna (183).

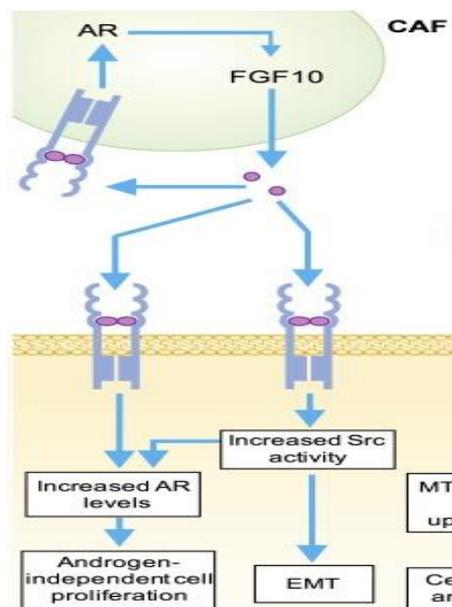
El FGFR2 se expresa en el epitelio prostático normal como la isoforma IIIb, que se une casi exclusivamente a FGF-7 y FGF-10 (132). El FGF-10 es un factor de crecimiento secretado que se une al receptor FGFR2IIIb, que se expresa en las células epiteliales prostáticas, pudiendo actuar potencialmente como un factor de crecimiento para estas células (182). A diferencia de FGF-7, el FGF-10 también se une a la variante IIIb de FGFR1, el FGFR1IIIb, receptor residente en las células estromales; y en la interacción con heparina y heparán sulfato de matriz pericelular (181).

El FGF-10 paracrino se sinergiza con la sobreexpresión de FGFR1/2 para inducir la transición epitelio-mesenquimal en un modelo preclínico de cáncer de próstata (179). La inhibición de la señalización de FGFR1 podría revertir el fenotipo neoplásico incluso en presencia de un exceso de FGF-10 mesenquimatoso (183).

En el CaP se observan cambios fenotípicos en el estroma que se asocian al cáncer que incluyen una expresión alterada de los factores de crecimiento como el PDGF, TGF- $\beta$ 1, y FGF-2, FGF-7 y FGF-10. FGF-10 junto a otros factores de crecimiento, se ve afectado significativamente por andrógenos y antiandrógenos en células estromales cultivadas in vitro (184). En la carcinogénesis prostática se produce un cambio fenotípico

de la expresión de FGFR2IIIb a la isoforma FGFR2IIIc con la pérdida final de la expresión del gen FGFR2 en algunos clones malignos (181). Se observa una mayor expresión de FGFR1 tanto en el cáncer de próstata humano como en modelos animales con una progresión a adenocarcinoma poco diferenciado (183).

La expresión de FGF-10 se estimula por la acción de los andrógenos y puede ejercer un efecto mitogénico sobre el epitelio prostático (92). Los andrógenos que actúan a través del RA estromal pueden provocar un aumento de la expresión de factores de crecimiento estimulando la progresión de CaP y la transformación maligna (184). FGF-10 se expresa en el estroma de próstata normal y tumores de próstata diferenciados que responden a andrógenos, siendo su expresión, por tanto, sensible a los andrógenos (181). Con todo, la expresión de FGF-10 se estimula por la acción de los andrógenos y puede ejercer un efecto mitogénico sobre el epitelio prostático pero no sobre las células estromales que lo expresan (92), mostrando el FGF-10 las propiedades de una andromedina que puede mediar indirectamente el control del crecimiento y la función de las células epiteliales por el andrógeno (181). La expresión del RA se ha detectado en CAF y la depleción del RA en estas células estromales dio como resultado una disminución en la expresión de FGF-10. Por tanto, el aumento de los niveles de RA en las células del estroma promueve la expresión de FGF-10 que luego actúa de manera paracrina para elevar los niveles de RA en las células epiteliales de la próstata y potencialmente también de manera autocrina para elevar aún más los niveles de RA en el estroma (179).



**Figura 6. Mecanismos subyacentes a las funciones promotoras de tumores de FGF-10 en el CaP (179)**

Factor de crecimiento de fibroblastos cuya expresión se potencia en las células y/o tejidos de CaP humano (133). La expresión mesenquimatosa de FGF-10 conduce al desarrollo de CaP y a una expresión mejorada del RA en el epitelio neoplásico, expresando niveles de RA más altos en las células cancerosas (179). Algunos estudios encuentran como la estimulación elevada de FGF-10 paracrino de las células epiteliales de próstata de ratón condujo al desarrollo de adenocarcinoma, predominantemente a través de la activación de FGFR1 epitelial. Estas lesiones mostraron niveles elevados de receptor de andrógenos (179).

La sobreexpresión de FGF-10 en los fibroblastos de la próstata induce experimentalmente la formación de PIN multifocal en el epitelio adyacente (183). Su aumento de expresión promueve la formación de CaP bien diferenciado (177). El PIN o adenocarcinoma inducido por FGF-10 podría persistir en un microambiente bajo en FGF-10 como resultado de cambios epiteliales sostenidos que evaden la dependencia crónica de este factor de crecimiento y la activación sostenida del RA (183).

Algunos estudios demuestran el papel de FGF-10 en la carcinogénesis de la próstata en sinergia con la sobreexpresión de FGFR1/2 y la sobreexpresión del protooncogen Src en células de ratones, induciendo tumores epiteliales de alto grado (182).

En trabajos con modelos murinos de CaP se encuentra que después de la castración del hospedador un subconjunto de células de adenocarcinoma de próstata inducidas por FGF-10 muestran supervivencia y proliferación continuas, lo que sugiere que la estimulación paracrina de FGF-10 puede contribuir al desarrollo de la independencia de los andrógenos (179).

La expresión estromal de FGF-10 puede facilitar la histología multifocal observada en el adenocarcinoma de próstata y sugieren que el eje FGF10 / FGFR1 es una diana terapéutica potencial en el tratamiento del cáncer de próstata sensible o refractario a hormonas (183).

Por todo esto, la señalización de FGF-10 es importante para la proliferación celular, diferenciación, supervivencia, adhesión y EMT (177). Se debe destacar la importancia de FGF-10 en la señalización aberrante en la tumorigénesis convirtiéndole en una diana terapéutica atractiva contra el cáncer (179), siendo necesario realizar más investigaciones moleculares básicas (177). Dirigirse a cascadas de señalización de factores de crecimiento similares a los factores de crecimiento de fibroblastos también puede retrasar la aparición de la independencia de la hormona andrógena, lo que plantea el mayor desafío clínico en el tratamiento del cáncer de próstata (183).

### 1.5.2 Factor de crecimiento transformante $\beta_1$

La familia del TGF- $\beta$  fue descubierta y purificada a principio de los años 80. Se aisló por primera vez de las plaquetas, logrando más tarde su clonación, forma parte de la superfamilia que lleva su nombre y que incluye proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento y diferenciación, la activina, la inhibina, y el factor inhibidor de los conductos de Muller (92).

El TGF- $\beta$  se considera una citocina pleiotrópica dado los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Se han identificado tres isoformas del TGF- $\beta$  en humanos: TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  y TGF- $\beta_3$ , que son altamente homólogas entre sí, siendo expresada cada una por su propio gen (regiones cromosómicas 19q13,1q41 y 14q24 respectivamente) (185).

La forma inicial inactiva o latente de TGF- $\beta$  puede ser activada por proteólisis. Al unirse el TGF- $\beta$  activo a sus receptores de membrana, se estimulan las vías de señalización intracelulares que regulan la migración celular (186).

Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  están implicados, entre otras cosas, en la morfogénesis, el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares, la regulación inmune, la reparación de tejidos, la inflamación y el cáncer, estando sus funciones mediadas por los mismos receptores (187).

El TGF- $\beta$  es un regulador positivo del crecimiento de las células del estroma, estimula la producción de la MEC, induce simultáneamente la detención del ciclo celular en la población de células epiteliales y hematopoyéticas, y es un inmunosupresor potente (187). Se ha observado que en concentraciones bajas del TGF- $\beta$  posee actividad pro-angiogénica, mientras que en concentraciones altas presenta actividades anti-angiogénicas, constituyendo así el efecto de TGF- $\beta$  completamente contrario dependiendo del contexto celular y de la concentración de citocina (188).

Se ha demostrado el papel central del TGF- $\beta$ , estimulando en las lesiones de HBP la transdiferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos y células musculares lisas con la producción de proteínas propias de la MEC. Es reconocida la necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos de inducción de esta patología en humanos, y su diferenciación con los procesos que acontecen en la zona periférica de la próstata también incluida por la relación andrógenos-RA (189).

Esta citocina regula diversos procesos celulares teniendo efectos pro y antitumorales. Se considera un potente supresor de tumores, inhibiendo la proliferación

de células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas. Sin embargo, esta citocina tiene un papel paradójico en el cáncer, pues en etapas tempranas suprime el crecimiento tumoral, mientras que en etapas avanzadas puede estimular su crecimiento (186).

Numerosos cánceres producen el TGF- $\beta$ , incluidos el CaP. En muchos casos, las células malignas derivadas de células epiteliales cuyo crecimiento es inhibido por TGF- $\beta$  en condiciones normales pierden la sensibilidad a este efecto del TGF- $\beta$ . Esta citocina promueve la progresión tumoral de diferentes formas: aumenta la angiogénesis que es esencial para el aporte de nutrientes a la masa tumoral en vías de crecimiento; inhibe el sistema inmunitario y por lo tanto la capacidad del sistema de defensa del huésped para destruir las células tumorales; y estimula la producción y el recambio de MEC; así el TGF- $\beta$  de origen tumoral suministra un sustento físico para el crecimiento y la progresión tumoral (92).

La transición epitelial a mesenquimatosa está asociada con la alteración de la estructura normal del epitelio y la invasión de las células del carcinoma en el estroma circundante. Un regulador importante de la EMT es el TGF- $\beta$ . Así, la parada de la señalización de TGF $\beta$  promueve el crecimiento y la proliferación celular en el epitelio pudiendo conducir a la carcinogénesis. La expresión de TGF- $\beta$  se correlaciona con la progresión del CaP y la mala evolución clínica, promoviendo un crecimiento invasivo y metástasis en el CaP la señalización de TGF- $\beta$  (190).

El TGF- $\beta$  puede actuar como sistema de freno del crecimiento de las células epiteliales prostáticas normales con regulación negativa y como factor positivo de estimulación del crecimiento de las células normales del estroma. Estas generalizaciones pueden modificarse en los cánceres o en los tejidos con HBP, en los cuales las células epiteliales modifican su respuesta a TGF- $\beta$  y ahora en lugar de inhibir pueden estimular el crecimiento (92).

Las células de CaP a menudo producen metástasis óseas y lesiones osteoblásticas en los sitios de formación de hueso nuevo. Los FC capaces de inducir la formación de hueso incluyen TGF- $\beta$  y los miembros de la familia de BMP. Los morfógenos óseos BMP y el TGF- $\beta$  estimulan la proliferación de fibroblastos e inhiben los osteoclastos, y por esta vía podrían causar el aumento de la formación de hueso que se observa en la metástasis osteoblástica. En las metástasis óseas, el TGF- $\beta$  latente puede ser activado por metaloproteinasa 9 (MMP-9) y metaloproteinasa 2 (MMP-2), promoviendo el crecimiento tumoral y constituyendo un quimioatrayente para las células tumorales (191). Así, se ha demostrado que la producción de TGF- $\beta$  por estroma asociado a CaP aumenta

el crecimiento e invasión de las células epiteliales de la próstata favoreciendo las metástasis óseas osteoblásticas en sistemas experimentales por parte del TGF- $\beta$  (192).

Por todo esto, al regular el TGF- $\beta$  al regular el crecimiento celular, la muerte y la inmortalización, se ejercen efectos supresores de tumores en células normales y en los carcinomas tempranos. Posteriormente, la señalización de TGF- $\beta$  cambia para promover la progresión del cáncer, la invasión y la metástasis tumoral. En consecuencia, los efectos opuestos del TGF- $\beta$  sobre las células epiteliales prostáticas normales y sobre el adenocarcinoma son importantes, pero continúan siendo un misterio pudiendo estar mediados por cambios de la función de los receptores del TGF- $\beta$  (193).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) es una citocina inmunosupresora y antiinflamatoria de 25 KDa de peso; fue identificada como un producto de células transformadas por el virus de sarcoma murino, constituyendo un regulador central de la función y proliferación de células T constituyendo un regulador central de la función y proliferación de células T (194).

El factor TGF- $\beta$ 1 es la isoforma más común y constituye el inhibidor más potente de la proliferación de células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y en varios tipos de células malignas. Por el contrario, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y ciertos tipos de células mesenquimales (194). Se considera inductor de apoptosis en células epiteliales e inhibidor en estromales. El TGF- $\beta$ 1 puede actuar como un mitógeno indirecto sobre células mesenquimales o como estimulador de la síntesis y el depósito de proteínas de la MEC. Regula la expresión de metaloproteinasas (MMPs) y aumenta la síntesis de inhibidores de proteasas (195).

TGF- $\beta$ 1 se secreta de forma inactiva o latente y puede formar dos tipos de complejos latentes, uno de ellos denominado péptido latente asociado (LAP) que se forma al asociarse TGF-  $\beta$ 1 con una proteína. Si además se asocia también con otra proteína de enlace el complejo se denomina proteína asociada a TGF-  $\beta$  latente (LTBP) (196). Parece ser que LTPB incrementa la eficiencia de secreción de TGF- $\beta$  desde las células y promueve la asociación de TGF- $\beta$  a la matriz y facilita su activación (193). Para que TGF- $\beta$  ejerza su acción deberá interactuar con los receptores correspondientes. Los receptores implicados son dos proteínas que constituyen un complejo receptor transmembrana de serina-treonina que comprende los receptores quinasas de tipo I y II (T $\beta$ RI y T $\beta$ RII). Prácticamente todas las células sintetizan TGF- $\beta$ 1 y todas las células expresan receptores para los TGF. Este hecho indica que TGF- $\beta$ 1 afecta de alguna forma

a todos los procesos fisiológicos, siendo estos dos receptores en las células de mamíferos los responsables de los efectos biológicos del TGF- $\beta$ 1 (196).

El inicio de la señalización requiere la unión de TGF- $\beta$ 1 al receptor T $\beta$ RII, que posteriormente transfosforila el receptor T $\beta$ RI para producir un complejo de señalización que a su vez activa las vías de señalización desde la membrana celular al núcleo, siendo la familia de proteínas Smad las transductoras de señales implicadas en la mediación de señales de TGF- $\beta$ 1; se sabe que Smad2 y Smad3 actúan como proteínas de señalización y factores de transcripción y son fosforiladas en serina que interactúa con el co-Smad, Smad4, se transloca al núcleo, se une a secuencias específicas de ADN y recluta co-activadores o co-represores para regular la transcripción de genes diana de TGF- $\beta$ . Son muchos los esfuerzos dirigidos al descubrimiento de fármacos que han conducido al desarrollo de inhibidores de la cinasa del receptor T $\beta$ RI (192). Existen también otras vías de señalización intracelular importantes adicionales para TGF- $\beta$ 1 que pueden señalar independientemente de los Smad, como por ejemplo, la vía de MAPK en la señalización de TGF- $\beta$ 1 que transducen señales extracelulares a respuestas intracelulares (197).

El TGF- $\beta$ 1 regula diversas actividades biológicas que incluyen el crecimiento celular, la muerte celular o la apoptosis, la diferenciación celular, la síntesis de MEC (197). El papel de TGF- $\beta$ 1 durante la fase proliferativa es la capacidad para estimular la angiogénesis y la deposición de colágeno en los tejidos (198). Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de MEC por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales, además de aumentar la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de MEC (194). La disminución de las interacciones celulares con proteínas de MEC, induce la expresión del TGF- $\beta$ 1, lo cual conlleva a la síntesis de varias proteínas de MEC y sugiere un mecanismo de autorregulación (194). En condiciones normales, existe un equilibrio entre los factores que inducen la producción de la MEC, suprimen la degradación de colágeno y la proliferación celular, como hemos dicho el TGF- $\beta$ 1, y factores que ejercen acción mitógena en el compartimento estromal, como el FGF-2 y el IGF.

El TGF- $\beta$ 1 también induce otros eventos intracelulares como la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular. En el contexto de la respuesta inmune, dependiendo de la concentración del TGF- $\beta$ 1, induce o inhibe la producción de citocinas por monocitos, pero inhibe la respuesta protectora de estas mismas células; promueve la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y neutrófilos; in vivo, aumenta las funciones efectora y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno-

específicos; estimula la secreción de IgA; inhibe la proliferación de linfocitos, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y ciertas líneas celulares tumorales (199). Por tanto, el TGF- $\beta$ 1 tiene diferentes funciones, que dependen del estado de activación celular, de su concentración, del balance de expresión de otras citocinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa; con todo, la distribución celular de su expresión in situ e in vivo está directamente asociada con el estado de diferenciación celular (194).

Es importante señalar la naturaleza multifuncional de TGF- $\beta$  ya que imparte efectos biológicos en ocasiones opuestos sobre diferentes tipos de células y, por tanto, TGF- $\beta$ 1 puede estimular en lugar de inhibir el crecimiento celular dependiendo del contexto celular (197).

Los TGF- $\beta$  regulan la proliferación de muchas células normales; sin embargo, en las células tumorales ocurre la pérdida de respuesta a esta citocina. Existe una correlación entre el aumento de la expresión de la proteína del TGF- $\beta$  con los estados avanzados de la tumorigénesis, así como la disminución de la supervivencia en cánceres epiteliales, neuroectodérmicos y de origen mesenquimal. El aumento de la expresión del TGF- $\beta$ 1 lleva a la pérdida de la respuesta inhibitoria de la proliferación celular inducida por este, y puede representar un mecanismo de escape de la célula tumoral que favorece la evolución del proceso neoplásico. Por ejemplo, en el carcinoma de colon y el glioblastoma tienen una pérdida progresiva de la respuesta inhibitoria de la proliferación por el TGF- $\beta$ 1, lo cual varía directamente con la evolución del tumor. Los mecanismos que aumentan la expresión del TGF- $\beta$ 1 pueden explicarse en parte por los procesos de regulación de la expresión de este gen; sin embargo, una vez que la célula tumoral pierde su capacidad para inhibir su proliferación por el TGF- $\beta$ 1, produce cantidades masivas de esta citocina. Esta condición proporciona una ventaja selectiva para la supervivencia de la célula tumoral, ya que el TGF- $\beta$ 1 induce de novo la angiogénesis y un estado de inmunosupresión. Además, el TGF- $\beta$ 1 tiene funciones importantes en la regulación del ciclo celular, por lo que no es sorprendente que las alteraciones genéticas con el desarrollo del cáncer ocurran en genes que están involucrados en la regulación de la proliferación celular por el TGF- $\beta$ 1. Defectos en los receptores del TGF- $\beta$ 1, en genes involucrados en la transducción de señal por el TGF- $\beta$ 1 y en proteínas que regulan el ciclo celular relacionadas con este, tienen implicaciones importantes en el proceso oncogénico (200).

Es aceptado que TGF- $\beta$ 1 ejerce múltiples papeles en las células epiteliales de la mayoría de tumores humanos, como su participación en el crecimiento celular. En

estadios tempranos de la tumorigénesis, TGF- $\beta$ 1 actúa como supresor tumoral; en cambio cuando el tumor está más desarrollado, los cambios genéticos y/o bioquímicos inducen a TGF- $\beta$ 1 a estimular la progresión tumoral por su actividad pleiotrópica, tanto en las células tumorales como en las células estromales no malignas (201).

Cambios fenotípicos observados en el estroma asociado al cáncer incluyen expresión alterada de los factores de crecimiento como el TGF $\beta$ -1 (202), jugando un papel importante en las interacciones estroma-epitelio, creando un ambiente favorable para la invasión y metástasis de la célula epitelial. Así por ejemplo en el cáncer de mama, varios estudios han demostrado que la expresión del receptor de TGF- $\beta$ 1 es mayor en el estroma en las mujeres con cáncer de mama de alto estadio (203).

TGF $\beta$ -1 es capaz de promover la angiogénesis y la transición de células epiteliales a células mesenquimales, lo que significa que participa en el proceso de invasión tumoral (204).

En el CaP, el TGF- $\beta$ 1 es un factor de crecimiento pleiotrópico que regula la proliferación celular, la quimiotaxis, la diferenciación, la respuesta inmune y la angiogénesis (192).

En las células epiteliales prostáticas normales, el TGF- $\beta$ 1 inhibe el crecimiento de las células epiteliales por bloqueo de la entrada de las células en la fase S (fase de síntesis de ADN del ciclo celular). Si se retiran los andrógenos hay una regulación hacia arriba del TGF- $\beta$ 1, así como del receptor del TGF- $\beta$  en la próstata normal de rata, de esta forma, los andrógenos tienen efecto de regulación inversa sobre el TGF- $\beta$ 1 y la expresión del receptor del TGF- $\beta$ . TGF $\beta$ -1 puede cooperar con los andrógenos prostáticos en la modulación estromal (92).

En el CaP, los andrógenos parecen perder su capacidad para regular el TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3 se expresan en el CaP humano, el TGF- $\beta$ 1 presenta expresión en exceso y tiene capacidad para suprimir el sistema inmunitario y promover la angiogénesis con formación de componentes de la MEC, así como incremento de la motilidad celular, todos factores importantes en la progresión de las células de CaP (205).

Vemos entonces como las células de cáncer de próstata humano y el estroma en el entorno del tumor producen una serie de factores pro-angiogénicos, y entre ellos se encuentra el TGF- $\beta$ 1 (206).

El TGF- $\beta$ 1 se sobreexpresa en el CaP, especialmente en la enfermedad avanzada. Se ha demostrado una regulación por incremento de TGF- $\beta$ 1 en tejidos de CaP y niveles altos de TGF- $\beta$ 1 en orina y suero en relación con una mayor angiogénesis

tumoral, metástasis tumoral, y con un resultado clínico deficiente (206). TGF- $\beta$ 1 promueve la progresión del tumor al alterar el microambiente del tumor, inhibiendo las respuestas inmunes (207), y estimulando la angiogénesis del tumor (208). Se ha demostrado experimentalmente que la supresión de la señalización del factor estromal TGF- $\beta$  puede retrasar la progresión de tumores andrógeno-independientes en ratones (206). Además, TGF- $\beta$  regulará la producción de ARNm del FGF-2 (209) y estimulará la activación del Factor Nuclear kappa- $\beta$  (NFk $\beta$ ) en las líneas celulares PC3 haciéndolas, de este modo, resistentes a la apoptosis (210).

La señalización de TGF- $\beta$  desempeña funciones complejas en la progresión del CaP. En el tejido prostático normal, la activación de la señalización del TGF- $\beta$ 1 inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis en las células epiteliales actuando como supresor de tumores. Se ha demostrado que la sobreexpresión del receptor de TGF- $\beta$  tipo II en células de CaP humano LNCaP puede suprimir la tumorigenicidad mediante la inducción de la apoptosis mediada por caspasa-1. Paradójicamente, TGF- $\beta$ 1 se sobreexpresa en el CaP, especialmente en la enfermedad avanzada. Se ha sugerido que las células de CaP son relativamente más resistentes a la apoptosis o inhibición del crecimiento mediada por TGF- $\beta$  debido a la regulación a la baja de los receptores de TGF- $\beta$  o una alteración de las vías de señalización de TGF- $\beta$  (206). De este modo, la señalización de TGF- $\beta$  actúa como supresor de tumores en la carcinogénesis pero promueve la progresión tumoral en tumores avanzados (211).

Varios estudios han identificado la concentración plasmática del TGF- $\beta$ 1 como un predictor de la progresión del CaP y el desarrollo de metástasis. TGF- $\beta$ 1 estimula la resorción ósea mediada por tumores, posiblemente al promover la producción de PTHrP por la célula tumoral, que a su vez estimula la resorción ósea. Ciertos estudios encuentran como el bloqueo farmacológico de la señalización de TGF- $\beta$ 1 con otro inhibidor del receptor de TGF- $\beta$  tipo I resulta en un aumento de la masa ósea. Se ha visto como el tratamiento con el inhibidor del receptor I del factor de crecimiento transformante beta LY2109761 aumentó el volumen de hueso normal en ratones con tumores, inhibiendo significativamente el crecimiento óseo de las células de CaP en ratones y viéndose como el aumento de la masa ósea puede ser un efecto deseable en hombres con osteopenia u osteoporosis secundaria a la terapia de ablación de andrógenos (192).

En la progresión del CaP, varias investigaciones estudian la asociación de los niveles plasmáticos pre y posoperatorios TGF- $\beta$ 1, demostrando como los niveles plasmáticos preoperatorios de este factor están asociados con la progresión y metástasis

a distancia del CaP pero no con el grado histológico de la enfermedad ni con el volumen de tumor local. Sin embargo, los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 no fueron diferentes entre pacientes con CaP y sujetos sanos. Observan como los niveles pre y posoperatorios de TGF- $\beta$ 1 se elevan significativamente en pacientes con extensión extraprostática, invasión de vesículas seminales y metástasis a los ganglios linfáticos. Para los pacientes sometidos a prostatectomía radical por enfermedad clínicamente localizada, los niveles plasmáticos preoperatorios de TGF- $\beta$ 1 se asocian con una eventual progresión del CaP, metástasis a los ganglios linfáticos regionales, supuestas micrometástasis ocultas en el momento del tratamiento primario y progresión agresiva de la enfermedad. Después de la extirpación de la próstata, el valor posoperatorio de TGF- $\beta$ 1 aumenta sobre los niveles preoperatorios para predecir la progresión de la enfermedad, permaneciendo elevado en pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos o distantes y/o enfermedad residual después de la cirugía, y disminuyendo TGF- $\beta$ 1 solo en pacientes aparentemente curados después de la cirugía definitiva (212).

Es importante señalar la expresión alterada de TGF $\beta$ -1 en las muestras de CaP con respecto a tejido prostático normal, jugando un papel en el desarrollo del tumor que debe ser investigado (213). En otros estudios se observa como algún genotipo de TGF $\beta$ -1 se asocia con un menor riesgo de CaP agresivo demostrando un efecto protector frente al CaP de alto grado y de mal pronóstico (214). En otras investigaciones se contempla un aumento de expresión de TGF $\beta$ -1 que se asocia con tumores más agresivos y mal pronóstico, dado que se hacen resistentes a su inhibición de la proliferación celular. Así vemos como distintos polimorfismos de TGF $\beta$ -1 actuarían de forma diferente en la progresión del CaP (215).

Por todo esto, el TGF- $\beta$ 1 es un objetivo candidato para la terapia del CaP avanzado, pudiendo constituir una futura diana de tratamiento precoz que evita la progresión.

### **1.5.3 Factor de crecimiento de hepatocitos**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (SF), se identificó en la década de 1980 con un peso molecular de 100 KDa, estando el gen que codifica para HGF localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (128). HGF es una citocina soluble que pertenece a la familia de factores de crecimiento relacionados con el plasminógeno. HGF/SF fue identificado por dos grupos que caracterizaron independientemente un factor mitógeno para los hepatocitos, y un factor

de movilidad de células epiteliales derivado de fibroblastos, respectivamente, y más tarde, los dos factores se identificaron como el mismo (216). HGF se clonó por primera vez como un mitógeno potente para los hepatocitos maduros. Entre sus funciones, destaca mediar la interacción tumor-estroma con actividades mitogénicas, motogénicas, y morfogénicas en varios tipos de células (217). La regulación proteolítica es una característica importante del HGF. El HGF de forma precursor inactivo de cadena única se produce activándose mediante escisión proteolítica en heterodímeros de cadena  $\alpha$  y  $\beta$  unidos por enlaces disulfuro mediante serina proteinasas tales como el uPA; activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA); factores de coagulación X, XI y XII; y un homólogo del factor XII. El HGF tiene una fuerte afinidad de unión con los proteoglicanos heparán sulfato, abundantes en la matriz extracelular (216).

El receptor de HGF es un receptor transmembrana de tipo tirosina quinasa, producto del protooncogén c-Met expresado por los epitelios y presente en las células endoteliales (128). El oncogen MET se aisló de una línea celular derivada del osteosarcoma humano, y se encuentra en el cromosoma 7 humano (218). La unión del HGF, el ligando natural del receptor c-Met, induce dimerización del receptor y la fosforilación activando la actividad quinasa del mismo, y produciéndose la activación mediada por MET de varias vías de señalización intracelular (219).

El HGF participa como un factor organotrófico en la regeneración y protección de tejidos como el hígado, pulmón, riñón, estómago, páncreas, corazón, cerebro etc.; se ha implicado en la embriogénesis, la reorganización tisular y la progresión tumoral. Promueve la proliferación, diferenciación, motilidad e invasión de células epiteliales al unirse a su receptor c-Met de superficie celular (220).

Además, HGF induce la angiogénesis tumoral, intensifica la actividad angiogénica potencial en las células endoteliales vasculares, actuando como factor paracrino responsable de la morfogénesis, el crecimiento celular, y la motilidad celular (221). Se ha demostrado que los fibroblastos asociados al cáncer promueven la dispersión celular, la EMT, y la migración de las células cancerosas de una manera dependiente de HGF (221). HGF aumenta la adherencia de las células tumorales al endotelio y mejora la transmigración a través de la matriz extracelular (222). Tanto el HGF como el c-Met están regulados positivamente en diferentes tipos de cánceres humanos, como el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, gástrico, esofágico etc. (221). Es así como la activación de las vías de señalización intracelular da como resultado la aparición de diversas características celulares del cáncer, incluida la proliferación celular, la supervivencia, la

inhibición de la apoptosis, la migración, la invasión y la metástasis (219). El HGF y su receptor c-Met se encuentra sobreexpresado y mutado a menudo en el cáncer, pudiendo intervenir en la patogenia del carcinoma de células renales. Se ha observado la expresión de HGF y su receptor en la mayoría de los carcinomas de células renales estableciendo correlación con el volumen tumoral, encontrando así como el HGF y su receptor c-Met pueden desempeñar un papel importante en la biología tumoral (92), destacando por ejemplo la sobreexpresión de c-Met en las metástasis óseas de cáncer renal (216). Por todo ello, los niveles circulantes de HGF pueden ser relevantes para el pronóstico en varios cánceres, sugiriendo como la monitorización de los niveles plasmáticos de HGF durante el tratamiento puede ayudar a predecir la respuesta (218).

El HGF es expresado en el estroma prostático donde activa de forma paracrina el receptor epitelial c-Met, normal o tumoral. Parece que la activación de este receptor podría contribuir a la progresión hacia el estado de andrógeno insensibilidad en el CaP, por lo que es una potencial vía de desarrollo de estrategias terapéuticas en combinación con la castración (223). En el CaP mejora las actividades invasivas de las células a través de la interacción tumor-estroma y la estimulación del tipo uPA y redes proteolíticas del receptor uPA (217).

El HGF y c-Met forman un sistema ligando-receptor clásico para las comunicaciones epitelio-mesenquimáticas en la próstata normal y cancerosa. El HGF se ha implicado en la EMT en numerosos tipos de cáncer, demostrando que la EMT inducida por HGF aumenta en potencial invasivo de líneas celulares de CaP humano (224).

El HGF induce la proliferación, diferenciación, motilidad e invasividad en líneas celulares de CaP. En la próstata, c-Met se expresa predominantemente por células epiteliales, mientras que HGF es sintetizado por las células estromales de próstata, expresándose c-Met en CaP localizados y metastásicos las células epiteliales de próstata normales (220), encontrándose c-Met con mayor frecuencia en crecimientos metastásicos de CaP en comparación con tumores primarios y una mayor expresión de c-Met en líneas celulares insensibles a los andrógenos con la mayor capacidad metastásica como ya hemos señalado (225).

Diversos estudios evalúan el nivel circulante de HGF en hombres con CaP e HBP, analizando la asociación entre sus concentraciones y el nivel de PSA. La elevación significativa de HGF sugiere un mayor riesgo de desarrollo de CaP, encontrando como los pacientes con CaP tenían concentraciones más altas de PSA y HGF, así como un volumen de glándula prostática significativamente menor que los pacientes con HBP. Son

varias las investigaciones que observan la expresión de HGF por los tejidos de CaP, relacionando una mayor concentración de HGF con un mayor riesgo de recurrencia del cáncer. Es así como el HGF puede ser un marcador de presencia de CaP y un marcador de su avance, mostrando como una mayor concentración de HGF en suero se asociaba con una menor supervivencia libre de progresión (221).

El HGF en combinación con el volumen de la próstata puede detectar el CaP en pacientes con niveles de PSA de la zona gris inferiores a 10 ng /ml. Algunos autores han demostrado que los niveles elevados de HGF en suero en pacientes con CaP estaban relacionados con el estadio y el grado de malignidad encontrando niveles más altos de este factor en pacientes con CaP refractario a hormonas. Así se ha visto como valores séricos de HGF en combinación con el volumen de la próstata fueron significativamente más altos en pacientes con CaP que en controles benignos con niveles de PSA en la zona gris, disminuyendo el número de biopsias de próstata innecesarias pudiendo ayudar como un marcador tumoral más específico a identificar pacientes con CaP (217).

En el CaP localizado, algunos estudios evalúan el nivel plasmático preoperatorio encontrando al HGF como un predictor independiente de metástasis de CaP a los ganglios linfáticos, invasión de vesículas seminales, y de la recurrencia de la enfermedad después de la prostatectomía radical y linfadenectomía bilateral por enfermedad clínicamente localizada. El uso de un biomarcador como HGF puede permitir una mejor selección de pacientes de alto riesgo, pudiendo utilizar el HGF para seleccionar a los pacientes más adecuados para los ensayos clínicos de terapias (222). Se ha demostrado que pacientes que mostraron positividad más alta de HGF tenían un periodo libre de recurrencia bioquímica más corto que los pacientes con menor positividad de HGF, encontrando como el PSA preoperatorio y la alta expresión de HGF fueron predictores independientes de recurrencia bioquímica después de la prostatectomía (226).

En el CaP avanzado, HGF y su receptor c-Met desempeñan funciones importantes en la progresión del CaP resistente a la castración, demostrando que la expresión de c-Met está asociado con la aparición de un tumor resistente a la castración (226). Por otro lado, se describe el HGF como un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión en pacientes con CaP sensible a la castración. De forma que, a mayor nivel de HGF mayor probabilidad de progresar a CaP resistente a la castración (227).

HGF y su receptor c-Met se enriquecen en el microambiente óseo y su expresión se correlaciona con la progresión de la metástasis ósea. El eje HGF/ c-Met está asociada con la progresión tumoral y metástasis como en el cáncer de mama y próstata, con una

mayor expresión en las lesiones metastásicas en comparación con las lesiones primarias (216). Así, pacientes con metástasis óseas por CaP mostraron un aumento significativo de la expresión de c-Met en las lesiones metastásicas, y también que la expresión de c-Met se correlacionó inversamente con la expresión del receptor de andrógenos que indicaría que la expresión de Met aumenta durante la progresión de la enfermedad (216). Las alteraciones en el RA o la sobreexpresión de c-Met están asociadas con una progresión independiente de los andrógenos, reprimiendo el RA la expresión de c-Met. Así, si bien la terapia de privación de andrógenos actual reprime la expresión de genes promotores del crecimiento que son activados por RA, también puede atenuar el papel supresor de RA sobre la expresión de c-Met y contribuir a la progresión tumoral hacia un CaP más agresivo y resistente a la castración (228).

Los estudios han demostrado que los niveles de HGF están elevados en la enfermedad metastásica del CaP, y los niveles más altos de HGF se han asociado con peores resultados (226). Además, c-Met se expresa preferentemente en las metástasis ganglionares y óseas en comparación con la HBP y el CaP primario (222).

HGF es una proteína implicada en el desarrollo del CaP que se encarga de controlar las uniones intercelulares estrechas que son cruciales para el proceso de metástasis (229). Hay estudios que indican que HGF disminuyó la resistencia transepitelial y aumentó la permeabilidad paracelular en cáncer de mama y en células endoteliales (230). Esto puede ocurrir en otros tipos celulares como en las células de CaP, donde el HGF regula la función de las uniones estrechas, siendo más susceptibles las células más agresivas, permitiendo así la progresión tumoral (230).

La inhibición de c-Met es una herramienta prometedora para la terapia dirigida al CaP (226). Los inhibidores de c-Met demostraron eficacia antiproliferativa cuando se combinan con la terapia de ablación de andrógenos para el CaP avanzado (226). En el tratamiento de CaP estudios observan como el HGF puede actuar ayudando al desarrollo de resistencia a abiraterona al restaurar las síntesis de andrógenos intratumorales que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad (231).

Así, los ejes de HGF y c-Met se describen como dianas terapéuticas prometedoras para el crecimiento de tumores metastásicos y la osteólisis de metástasis óseas (216).

#### **1.5.4 Factor de crecimiento derivado de plaquetas B**

El PDGF fue aislado en 1974, a partir de los gránulos alfa de las plaquetas sanguíneas (128). El PDGF se expresa en muchos tejidos y se encuentra en orina, si bien

deriva sobre todo de plaquetas, y una forma modificada es expresada por el oncogen *c-sis* (92).

El PDGF, con un peso molecular de 30 KDa, tiene fuerte efecto mitogénico sobre las células mesenquimáticas y el tejido conectivo, induciendo en las células la competencia para responder a otros factores de crecimiento, demostrándose su expresión en modelos de tumores prostáticos y células cultivadas (92). Es quimioatrayente para varios tipos celulares como células mesenquimales, fibroblastos, células vasculares del músculo liso y células glomerulares mensangiales (232).

La familia incluye cinco isotipos de PDGF (AA(A), BB(B), AB, C y D). Este grupo está estructural y funcionalmente relacionado con la familia del VEGF (128). Los PDGFR son tirosina cinasas diméricas que poseen cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que se expresan en la mayoría de las células, aunque predominio de  $\beta$ . En apariencia, los dos receptores inducen funciones celulares diferentes (92). La unión ligando-receptor inicia una cascada de reacciones que culmina con la activación de factores de transcripción (128).

PDGF estimula la liberación del TGF- $\beta$ , y promueve la diferenciación miofibroblástica. Además, induce la secreción del IGF-1, del HGF, de FGF-2 y de endotelina-3, siendo un potente mitógeno para las células mesenquimales, capaz de regular la angiogénesis y la invasión tumoral (233).

Este factor plaquetario está implicado en el desarrollo del sistema músculo-esquelético y en la patogenia de algunas afecciones del mismo, estando involucrado en la reparación tisular después de un daño, ya que su papel fisiológico es controlar el crecimiento del tejido conectivo, modifican la reactividad de las células vasculares y de otras células sanguíneas en la angiogénesis y la inflamación (234).

PDGF es expresado por varios tumores humanos como osteosarcoma, melanoma, oligodendroglioma... Las células endoteliales liberan factores de crecimiento como el PDGF que estimulan a las células tumorales (efecto paracrino) (235). El PDGF es un polipéptido producido por los osteoblastos en el microambiente óseo, y estimula la replicación, la resorción ósea y la degradación del colágeno. Estudios sobre metástasis óseas en el cáncer de mama encuentran una gran producción de PDGF y una mayor propensión a metástasis (236). En el cáncer renal esporádico estudios identificaron las vías de VEGF y PDGF como blancos moleculares. Estos factores de crecimiento se unen a tirosina cinasas del receptor regulando la proliferación y supervivencia celular promoviendo así la angiogénesis asociada al tumor y el crecimiento. Se encuentra que la

inhibición de las vías de señalización de VEGF y PDGF puede inhibir la angiogénesis y la progresión tumoral (92).

El PDGF se secreta en muchos tejidos del sistema urinario. Es un fuerte factor mitogénico y proliferativo, siendo su interés como mediador de los efectos de la inflamación sobre el crecimiento de la próstata. La inflamación tiene estrecha asociación con la HBP y más recientemente con CaP (92).

PDGF es importante en la patogénesis de las metástasis óseas, y se expresa en el 80% de los pacientes con CaP metastásico hormono-independiente (237).

El PDGF-A mantiene una gran homología, alrededor de 50% con PDGF-B. Las formas A y B se activan intracelularmente en el proceso de exocitosis. El PDGF y sus receptores desempeñan papeles clave en la proliferación y diferenciación del mesénquima, así como el desarrollo del riñón, sistema cardiovascular, cerebro, pulmón y tejido conectivo. En los tejidos adultos se encuentran asociados con los procesos de regeneración tisular, inflamación y angiogénesis, así como con la génesis de algunos tumores, estimulando la osteogénesis, y aumentando la síntesis de la matriz extracelular (234).

El PDGFR se encuentra sobreexpresado en tumores sólidos, expresándose en el 88% de las muestras de CaP, y también en su lesión precursora, la PIN, lo que sugiere que la expresión de PDGFR se observa temprano en la progresión del CaP. La subunidad  $\beta$  de PDGFR es responsable de funciones celulares como la migración, la proliferación, y del efecto angiogénico de PDGF. La expresión de PDGFR $\beta$  se relaciona con la progresión de CaP. Estudios encuentran un nivel de expresión de PDGFR en CaP de 88% de CaP primario y 80% de CaP metastásico (238).

Las células del CaP expresan niveles elevados del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y esta vía de señalización utiliza la vía PI3K/Akt, que interviene en la progresión del CaP (92). El bloqueo experimental de uno de sus receptores, el PDGFR $\beta$ , produce una disminución de la densidad vascular e incremento de la apoptosis superior a la castración en modelos de cáncer de próstata murino (239).

El gen del Factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B) está localizado en el 22q13.1 y es un gen que codifica una proteína que actúa como factor de crecimiento. PDGF-B está compuesto por 241 aminoácidos, son procesados intracelular y proteolíticamente por su extremo N-terminal con el fin de eliminar el propéptido que los mantiene inactivos, durante el proceso de exocitosis (240). Las isoformas PDGF-B y

PDGF -D se unen y activan específicamente al PDGFR $\beta$ , pudiendo también PDGF-B activar al receptor PDGFR $\alpha$  (241).

PDGF-B es el equivalente del oncogen *c-sis*, uno de los primeros oncogenes conocidos que codifica un potente mitógeno y que ha sido relacionado con el desarrollo embrionario, regeneración del tejido, osteogénesis, fibrosis, arteriosclerosis y neoplasias. Existen tumores primarios y líneas celulares tumorales que coproducen el PDGF y su receptor causando la estimulación autocrina de sus células tumorales (242).

El PDGF-B incrementa la aparición de tejido de granulación, por ejemplo en las quemaduras y el desarrollo de matriz extracelular (128).

Los animales nulos para PDGF-B o PDGFR $\beta$  padecen severas anormalidades cardiovasculares y hemorragias en distintos órganos, además de un desarrollo glomerular anormal, con pérdida del mesangio (128).

El PDGF-B tiene un efecto mitogénico sobre las células del estroma de la próstata (243), y estimula la secreción de ácido hialurónico (229), uno de los componentes de la matriz extracelular, que se relaciona con la etiología de la HBP (243). Se ha demostrado que las células cultivadas derivadas de tejido prostático humano expresan receptores de PDGF $\beta$  de alta afinidad de unión con PDGF-B. Estudios demuestran que los receptores de PDGF se activan en respuesta al factor de crecimiento induciendo la mitogénesis. El tratamiento con PDGF-B de células prostáticas humanas cultivadas derivadas de pacientes con HBP activa la vía de transducción de señales del receptor de PDGF. La adición de PDGF-B al medio provoca un aumento variable pero dependiente de la dosis, constituyendo un potente mitógeno para las células humanas derivadas de pacientes que presentan hiperplasia prostática (244). La elevación en la expresión de PDGF-B por parte de los fibroblastos de HBP, se describió ya en los años noventa viendo como este factor tiene un importante poder mitótico sobre las células del tejido conectivo, células musculares lisas vasculares, células gliales y células epiteliales especializadas (245). Las células de estroma prostático tienen una alta afinidad por los receptores de PDGF $\beta$  y la exposición al mismo da lugar a proliferación celular (244). Existe así, una mayor evidencia de la implicación de PDGF $\beta$  en la etiología de la HBP, demostrando que induce la proliferación de las células estromales (243). Además, en HBP hay un aumento del ácido hialurónico, componente importante de la matriz extracelular, y que las células responden más a PDGF $\beta$ , lo que sugiere que este factor induce la producción de ácido hialurónico que a su vez está en relación con la progresión de HBP, pudiendo llegar a

considerarlo como marcador diagnóstico de HBP y analizar su papel en la posible progresión de la enfermedad (243).

PDGF-B es capaz de inducir la liberación de componentes de la matriz (128), y de varios factores como el IGF1, el HGF y el FGF-2, los cuales subsecuentemente pueden también modular el crecimiento tumoral y el ambiente tumoral (233).

Los efectos de PDGFs en la promoción tumoral son principalmente autocrinos, estromales y angiogénicos. Se ha observado un incremento de la expresión de PDGF-B en varias líneas tumorales de mama, así como en otras líneas celulares malignas no hematopoyéticas como melanoma, cáncer de ovario y CaP (232).

PDGF-B se asocia a CaP en varios estudios. Las células CaP producen PDGF-B, que permite a las células CaP escapar a la vigilancia de la inmunidad. Se ha sugerido que el receptor de nuestro factor PDGF-B se sobreexpresa y activa durante la progresión del CaP, participando el PDGF-B en la fisiopatología del CaP, y aumentando su expresión durante el proceso tumorogénico. En el CaP estudios observan el uso potencial del PDGF-B como un biomarcador de orina para el diagnóstico precoz de CaP y encuentran como los pacientes con CaP tenían mayores niveles de PSA y PDGF-B. PDGF-B mostró una capacidad predictiva significativa para CaP. La detección de PDGF-B en orina mejoró la precisión diagnóstica en el diagnóstico de CaP. Nuestro marcador PDGF-B muestra en estudios una capacidad predictiva significativa para CaP tanto en la población general como en la población de pacientes de zona gris con PSA 4-10 ng / ml, donde existen dilemas diagnósticos de pacientes con niveles elevados persistentes de PSA y biopsias de próstata negativas. Por supuesto, se necesitan más estudios para establecer el PDGF-B como un biomarcador de orina que podría ayudar a mejorar la capacidad de diagnóstico del PSA (246).

La activación del PDGFR $\beta$  se asocia con progresión y recurrencia de CaP después de la prostatectomía radical (247). Estudios demuestran que una alta expresión de PDGFR $\beta$  en el estroma del CaP se asocia de forma significativa con la recurrencia bioquímica y clínica en pacientes con CaP tratados mediante prostatectomía radical, y encuentran que la expresión media de PDGFR $\beta$  es mayor en el estroma tumoral que en el estroma normal. Al investigar los ligandos PDGF-B y PDGF-D, observan mayor expresión del PDGF-D en el epitelio tumoral en comparación con el epitelio normal, no encontrando diferencias significativas en el resultado clínico según la expresión de PDGF-B o PDGF-D (241).

Otro estudio en cuanto a el análisis de los ligandos de PDGFR $\beta$  en CaP reveló una asociación entre los ligandos y la puntuación de Gleason, así como el estadio tumoral; si bien, es PDGF-D que muestra un aumento de la angiogénesis tumoral en comparación con el PDGF-B que impulsa una mayor invasividad en células epiteliales de la próstata y una mayor correlación con estadio tumoral y el aumento de la puntuación de Gleason en comparación con PDGF-B (247).

Tanto el PDGF-B como el PDGF-D desencadenan la aparición y crecimiento tumoral inicial (247). Estudios señalan la sobreexpresión del PDGF-B en tejidos tumorales y respalda la hipótesis de la red de señalización de PDGF-B como un regulador en la progresión del CaP (248). PDGF-B acelera el crecimiento del CaP al promover la proliferación de células madres mesenquimales las cuales favorecen el crecimiento del cáncer al facilitar el estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral. Así, las células de CaP producidas por PDGF-B favorecen la proliferación de las células madres mesenquimales permitiendo que las células CaP se escapen de la vigilancia de la inmunidad en el microambiente inflamatorio tumoral (249).

Una terapia dirigida al estroma mejora los efectos de castración, estudios observan como PDGFR $\beta$  no disminuye en el estroma después de la castración, creando un ambiente que evita la involución vascular. Cuando se añadió simultáneamente a la castración una terapia dirigida al estroma tumoral que inhibía el PDGFR $\beta$  se produjo una disminución de la densidad vascular, un aumento de la apoptosis de las células tumorales y una disminución del crecimiento del tumor en comparación con la castración sola, pudiendo así mejorar los efectos de solo la castración (239).

La vía de señalización del PDGF se ha implicado en los mecanismos tanto epiteliales como estromales de la progresión del CaP postulándose como un objetivo para la terapia en CaP y en metástasis óseas. Se ha establecido el tratamiento con inhibidores de las vías del PDGF para varios tipos de cáncer (241).

Finalmente señalar la importancia de la red reguladora de PDGF-B en la progresión del CaP, que nos ayudará a comprender el papel y los mecanismos de PDGF-B en la promoción del crecimiento del CaP y proporcionará conocimientos valiosos para futuras investigaciones sobre la terapia anti-PDGF apuntando aún más la necesidad de una mayor investigación en este campo (248).

## 1.6 Metaloproteinasas

Las MMPs son enzimas que participan en la remodelación de las proteínas de la matriz extracelular (92), y constituyen un conjunto de enzimas proteolíticas dependientes de zinc descritas por primera vez hace casi medio siglo (250). La familia de las MMPs humanas consta de más de 20 miembros de endopeptidasas que se pueden dividir en subgrupos: colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilisinas (MMP-7), metaloproteinasas de membrana y otras MMPs nuevas (251). El modelo estructural de las MMPs contiene tres dominios: el propéptido N-terminal, el dominio catalítico, y el dominio C-terminal que está vinculado al dominio catalítico que contiene zinc (250).

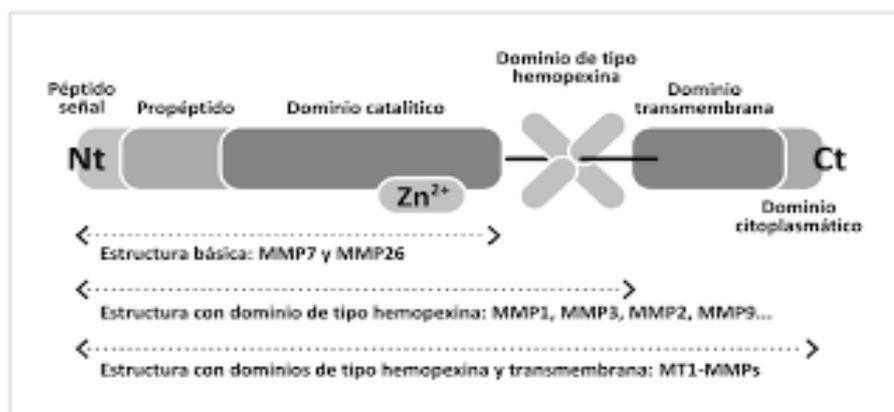


Figura 7. Estructura básica de las metaloproteinasas (252)

Las MMPs se sintetizan como zimógenos inactivos y se activan predominantemente por otras MMPs o mediante escisión de proteínas. Su actividad se encuentra regulada por inhibidores endógenos, entre ellos los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) que son proteínas capaces de inactivar a las MMPs (253).

Constituyen un conjunto de enzimas que desempeñan un papel esencial en la degradación del tejido conectivo estromal y los componentes de la membrana basal, implicándose en los procesos celulares biológicos como el desarrollo embrionario, enfermedades neurológicas, artritis, y enfermedades cardiovasculares (254). Dijimos como estas enzimas remodeladoras son reguladas por inhibidores tisulares de las MMPs. La falta de regulación negativa de las MMPs se vincula a procesos patológicos, así por ejemplo en la enfermedad de la Peyronie, si las MMPs de la matriz no son reguladas negativamente, podrían actuar como un mecanismo en el proceso de cicatrización anómalo, estudios encuentran una expresión más alta de los inhibidores tisulares de las

MMPs en todos los componentes de las placas de la Peyronie siendo así probable que la inhibición de las enzimas anticicatrizantes represente otra faceta de la etiología de la lesión que se reconoce en esas placas (92).

La función de las MMPs en la escisión proteolítica de los componentes de la matriz extracelular tiene un papel importante en el desarrollo maligno, participan en la remodelación del estroma, son potentes reguladores de la inflamación, en la liberación de factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis, la migración, la proliferación celular, y la metástasis (255). Además las MMPs pueden producir un fenotipo más agresivo en el cáncer mediante la generación de células resistentes a la apoptosis (251).

Las MMPs son importantes en la interacción entre el tumor y el estroma. La interacción in vitro entre el tumor y las células del estroma induce fenotipos que conducen a la invasión y producción de metástasis (256). De esta forma, las células tumorales con fenotipo mesenquimal pueden secretar MMPs induciendo un aumento de la motilidad, que promueve la invasión y la migración. Estas enzimas se liberan en el estroma en respuesta a múltiples estímulos químicos (257).

Las MMPs tienen su papel en la degradación de la matriz extracelular y de la membrana basal, facilitando la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis (251). Constituyen los principales efectores en la degradación del colágeno estromal como paso inicial de la invasividad neoplásica (98). Son capaces de influir en el comportamiento de las células tumorales in vivo, debido a su capacidad para adherirse a factores de crecimiento, receptores celulares de superficie, moléculas de adhesión celular y citocinas (253). El aumento de la expresión de MMPs se ha asociado con un mal pronóstico y una menor supervivencia en varias neoplasias malignas como el carcinomas de esófago, estómago, colon, mama, páncreas, pulmón, riñón, ovario, próstata (258).

El aumento de la expresión de MMPs en el CaP se ha demostrado en el desarrollo de CaP frente a la HBP y la PIN (258). La expresión de las MMPs tiene un papel importante en la biología molecular del CaP, demostrando que la sobreexpresión de las MMPs induce el crecimiento del tumor de próstata y aumenta el desarrollo de metástasis, pudiendo constituirse como indicadores de la agresividad tumoral (251).

### **1.6.1 Metaloproteinasa 2**

La MMP-2 de la matriz, miembro de la familia de las MMPS, es una endopeptidasa capaz de degradar la matriz extracelular, con un peso molecular de 72 KDa, y que pertenece al grupo de la gelatinasa (gelatinasa A), denominada así por su afinidad por el colágeno tipo IV desnaturalizada. Presenta una estructura común con otras MMPs, formada por un pro-peptido con un dominio catalítico N-terminal que contiene zinc, y un dominio C-terminal tipo hemopexina (259).

La MMP-2 es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos: macrófagos, mastocitos, fibroblastos, células dendríticas, endoteliales, hematopoyéticas (252). Fisiológicamente la MMP-2 participa en el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la ovulación, la involución mamaria, la cicatrización, y se encuentra involucrada en la formación osteoblástica de hueso y/o inhibición de la reabsorción osteoclástica (254). La MMP-2 activa puede escindir la matriz extracelular despejando el camino para las células tumorales invasoras (191). Su actividad está inicialmente regulada por el TIMP), en concreto TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. (252).

La MMP-2 interactúa en procesos no tumorales como la arteriosclerosis, el infarto de miocardio, y el ictus (260). Participa también en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (261).

Se ha observado altos niveles de MMP-2 en diferentes tumores, así, en el cáncer gástrico altos niveles epiteliales de MMP-2 están asociados a una supervivencia corta, asociándose a mal pronóstico de la enfermedad (252). En tumores de cáncer de mama invasivos los niveles de la MMP-2 están asociados con un pronóstico desfavorable, una alta actividad de MMP-2 está relacionada con la presencia de metástasis ganglionar y baja supervivencia en estadios tempranos (262).

En los tumores uroteliales diversas moléculas estimulan un comportamiento invasor y metastásico e incluyen las que facilitan la invasión como la expresión reducida de E-cadherina y aumento de la expresión de colagenasas tipo IV, como la MMP-2. Las mediciones de estas sustancias en tejido, suero y orina se han correlacionado con el comportamiento clínico del tumor. Estudios han observado que un cociente alto entre MMP-2 y TIMP-2 en sueros de pacientes con cáncer urotelial invasor que se han sometido a una resección completa predecía bajas tasas de recurrencia sin tumor y de supervivencia (92).

Las MMPs tienen un papel menos importante en la HBP y muchos trabajos encuentran una menor expresión de MMP-2 en HBP en comparación al estroma del CaP (100). Sin embargo, otros estudios demuestran una mayor expresión de MMP-2 por fibroblastos en HBP comparando con fibroblastos del tejido con cáncer (101), apoyando otras investigaciones la mayor expresión en CaP (263). En definitiva, la expresión de MMP2 se encuentra elevada en cualquier alteración del tejido prostático, desde HBP a la presencia de tumores localizados o metastásicos o incluso la deprivación androgénica.

Centrándonos en el CaP estudios evalúan la expresión de MMP-2 en el CaP, y asocian el aumento de la MMP-2 con un grado Gleason tumoral alto, un estadio patológico avanzado, y la recurrencia de la enfermedad (258). La expresión de MMP-2 se asoció significativamente con el grado de malignidad del CaP, destacando su papel en el crecimiento tumoral y la metástasis viendo su potencial para poder usar a la MMP-2 como marcador molecular del CaP (263). Además la expresión aumentada de MMP-2 se correlaciona negativamente con la supervivencia libre de enfermedad en CaP (264).

La expresión de MMP-2 tiene un papel relevante en la progresión del cáncer por su acción degradante sobre la membrana basal (250). Estudios encuentran que la expresión de MMP-2 por las células similares a fibroblastos se asoció inversamente con la recurrencia bioquímica (265). El aumento de la actividad de la MMP-2 en la micrometástasis aumenta la expresión de MMP-2 en las células estromales circundantes, y podría promover la angiogénesis y el crecimiento tumoral, dando como resultado la enfermedad androgénica metastásica independiente (266). En las metástasis óseas, el TGF- $\beta$  latente puede ser activado por MMP-2 promoviendo el crecimiento tumoral y servir como un quimioatrayente para las células tumorales (191).

En definitiva, la MMP-2 está sobreexpresada en muestras de tumor humano y se ha asociado con células altamente invasivas considerándola así una importante diana contra el cáncer, y el diseño de inhibidores selectivos de esta enzima puede conducir a interesantes agentes anticancerosos (254).

### **1.6.2 Metaloproteínasa 9**

La MMP-9 o gelatinasa-B, con un peso molecular de 92, 85 y 82 KDa para la proenzima, forma intermedia y enzima activa, respectivamente, posee una estructura homóloga a MMP-2 con la excepción de un dominio de enlace O-glicosilado más largo, que le confiere flexibilidad a la enzima, siendo esta característica su principal distintivo (267).

La MMP-9 degrada componentes de la membrana basal, especialmente el colágeno IV, además de otras sustancias pericelulares como la laminina y la fibronectina. A diferencia de la MMP-2, que es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos, la MMP-9 está casi ausente en tejidos normales encontrándose limitada a monocitos y macrófagos (252).

Se ha identificado su presencia en diferentes procesos inflamatorios, cardiovasculares, autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas como en el Alzheimer, osteoarticulares y neoplasias, entre las que se encuentran el cáncer de vejiga y de próstata. Los niveles séricos de MMP-9 son casi indetectables en condiciones fisiológicas, lo que hace que el valor diagnóstico y pronóstico de cuantificación de la enzima, tenga un valor significativo, siendo así como concentraciones elevadas de MMP-9 se asocian generalmente a peor pronóstico de la enfermedad tumoral (268).

La expresión de la MMP-9 puede ser inducida en caso de remodelación tisular como el desarrollo embrionario, cicatrización o invasión tumoral (252). Contribuye al control de la división celular, confiriendo resistencia a la apoptosis y como activador de angiogénesis con la liberación del VEGF (269). Decir que entre las principales MMPs implicadas en la angiogénesis tumoral se encuentra la MMP-9. Tiene su papel regulando la biodisponibilidad del VEGF, inductor potente de la angiogénesis tumoral (250). Otra función de la MMP-9 es su participación en la linfangiogénesis, con la formación de nuevos vasos linfáticos, y la posibilidad de diseminación de metástasis hacia la linfa (250).

La MMP-9 está altamente expresada en tumores de varios orígenes y especies. La sobreexpresión de la MMP-9 induce la expresión de factores angiogénicos (252). En tumores de cáncer de colon la expresión de la MMP-9 se encuentra aumentada asociándose a mal pronóstico de la enfermedad. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas se considera la expresión de la MMP-9 como un biomarcador tumoral (252). En tumores de cáncer de mama invasivos los niveles de la MMP-9 están asociados con un pronóstico desfavorable, así Vizoso et al. demostraron en sus estudios que una alta expresión de MMP-9 se correlaciona significativamente con la agresividad tumoral y mal pronóstico en el cáncer de mama (270). La MMP-9 está relacionada con la invasión tumoral y la metástasis como hemos dicho por su capacidad para degradar el colágeno tipo IV e inducir la angiogénesis (271). La determinación de MMP-9 en suero puede utilizarse como un factor pronóstico de la enfermedad, estando elevada en pacientes con

estadio tumoral avanzado, con ganglios positivos y ausencia de receptores para estrógenos (252). Se ha descrito en el cáncer de mama una producción de MMP-2 que aumenta durante las primeras fases, mientras que la activación de MMP-9 se produce en etapas posteriores en la progresión de la enfermedad (82). En los tumores de vejiga estudios observan que la expresión tisular y la excreción urinaria de MMP-9 estaban aumentados en todos los pacientes con cáncer de vejiga, y que los niveles reflejaban el grado y el estadio tumoral (92). La MMP-9 del cáncer urotelial está aumentada por la interleucina-8, que es producida por células inflamatorias y neoplásicas, y la MMP-9 puede aumentar el VEGF aumentando la vascularización del tumor (92).

En pacientes con enfermedad prostática, estudios encuentran que la actividad de MMP-9 aumenta en la orina de pacientes con hiperplasia benigna de próstata en comparación con pacientes con CaP (272). En otras investigaciones encuentran que la hiperplasia de próstata causada por obesidad a largo plazo se caracteriza por un alto depósito de matriz extracelular y un mayor contenido de MMP-9 y de VEGF. Sin embargo, en otros trabajos encuentran una ausencia casi total o escasa cantidad de la expresión de MMP-9 en los cultivos de hiperplasia de próstata (100).

En comparación con las patologías benignas, los carcinomas de próstata tenían una mayor expresión de todas las MMPs. Investigaciones encuentran expresiones significativas más altas de la MMP-9 en tejidos en CaP que en tejidos de hiperplasia benigna de próstata, así las altas expresiones de MMPs podrían identificar lesiones benignas de próstata con riesgo de desarrollar cáncer o incluso asociadas a lesiones malignas no detectadas (251). Ha sido demostrado también un aumento de expresión sérica del ARNm de la MMP-9 en pacientes con carcinoma prostático frente a pacientes sin tumor (273).

En estudios realizados con pacientes con CaP clínicamente localizado sometidos a prostatectomía radical encuentran que una sobreexpresión de la MMP-9 por parte de los fibroblastos tumorales prostáticos se asocia con una mayor probabilidad de recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical (251). Trabajos encuentran que en aquellos pacientes que no tienen recurrencia bioquímica tras la cirugía de próstata los niveles de MMP-9 disminuyeron dentro de los seis meses posteriores a la prostatectomía (274).

La expresión aumentada de MMP-9 en el CaP se correlaciona con mayor Gleason y fenotipos invasivos. Algunos estudios han demostrado un aumento significativo en los niveles de MMP-9 en pacientes con CaP en asociación con variables clínicas como PSA >4ng/ml y puntuación de Gleason >7 (274). La expresión de MMP-9 se correlacionó

positivamente con el estadio tumoral, extensión extracapsular, margen quirúrgico positivo e invasión linfovascular y perineural, asociándose también con una supervivencia libre de enfermedad más corta teniendo así un papel esencial en la progresión del adenocarcinoma de próstata (275).

En el CaP resistente a la castración estudios encuentran un nivel sérico de MMP-9 mayor en dichos pacientes en los que se produjo la progresión de la enfermedad (276). El nivel elevado de expresión del RA también se asocia con metástasis en el CaP resistente a la castración, y se encuentra una interacción entre el RA y las vías de señalización de MMP-9, demostrando que tanto la sobreexpresión del RA como la estimulación con DHT producen un aumento de MMP-9, pudiendo también el RA inducir la expresión de MMP-9 en las células con CaP de manera independiente de los andrógenos (277).

Como ya hemos señalado la MMP-9 se ha relacionado con invasión tumoral y desarrollo de metástasis por su especial capacidad para degradar el colágeno tipo IV e inducir angiogénesis (253). En el CaP metastásico estudios demuestran el requerimiento de MMP-9 para las metástasis de CaP observando un incremento sérico de MMP-9 en pacientes con CaP metastásico frente a pacientes con carcinoma localizado (273).

Las MMPs están involucradas en el proceso de formación de hueso y se postula que están involucradas en el proceso de metástasis, en particular la MMP-9. Trabajos encuentran que la MMP-9 contribuye a las lesiones metastásicas osteolíticas, siendo estas lesiones más similares a las lesiones óseas típicas inducidas por tumores mamarios que a las típicas lesiones óseas inducidas por cáncer de próstata, y observan que a medida que las células de cáncer de próstata PC3 colonizan el hueso, se observa un aumento en la actividad enzimática de MMP-9 (191). Otros estudios demuestran la implicación de MMP-9 como modulador de lesiones metastásicas óseas de origen osteoblástico, osteoclástico o mixto (278). En las metástasis óseas, el TGF- $\beta$  puede ser activado por MMP-9 promoviendo el crecimiento tumoral, y servir como un quimioatrayente para las células tumorales (191).

Varios estudios que han evaluado la asociación entre la MMP-9 y el riesgo de CaP encontrando evidencias que la expresión de MMP-9 contribuye al riesgo de CaP, asociando la sobreexpresión de la MMP-9 en CaP frente a la baja expresión en tejidos normales o en tejido prostático benigno. Así, la MMP-9 se convierte potencialmente en un importante marcador tumoral de próstata, y en una importante diana terapéutica para el desarrollo futuro de fármacos (278).

### 1.6.3 Metaloproteinasa 11

La metaloproteinasa 11 (MMP-11) o estromalisina-3 tiene como sustratos los colágenos tipo IV, V, IX y X, la laminina, la elastina, la fibronectina, la caseína y proteoglicanos (279). Se identificó por primera vez en las células estromales que rodean los carcinomas de mama invasivos (280).

La MMP-11 digiere diversos componentes de la MEC. Diferentes estudios indican que las estromalisinas son elaboradas por fibroblastos del estroma al ser activados por una glicoproteína de membrana llamada EMMPRIN (inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular) producida por las células tumorales. Esta interacción lleva a la degradación de la membrana basal y de la MEC (252).

La expresión normal de MMP-11 está presente durante la embriogénesis y la cicatrización de heridas (251). Así, el gen que codifica para la MMP-11 tiene una expresión aumentada en la fase inflamatoria de la cicatrización, lo que sugiere que su expresión está mediada por factores producidos por las células inflamatorias en procesos benignos de cicatrización o por las células tumorales en procesos neoplásicos (281).

La única MMP inducida por el tejido adiposo que afecta directamente la progresión del cáncer es la MMP-11. La MMP-11 se encuentra relacionada con los procesos de adipogénesis, siendo expresada por el tejido adiposo durante la invasión tumoral, regula negativamente la adipogénesis, promoviendo la progresión tumoral (250).

La MMP-11 tiene un papel importante en la progresión de algunos carcinomas en humanos y se expresa principalmente en fibroblastos peritumorales de neoplasias con una elevada invasión local. La MMP-11 puede ser un factor derivado del estroma necesario para la progresión de algunas neoplasias epiteliales malignas (281). Se expresa por células del estroma, no por células epiteliales, lo que puede indicar que la MMP-11 promueve la progresión tumoral al inducir el microambiente tumoral (282). Así, durante la tumorigénesis la función celular de la MMP-11 es favorecer la supervivencia de las células cancerosas en el microambiente del estroma por la disminución de la apoptosis y de la necrosis (98).

Se ha demostrado una sobreexpresión de MMP-11 en áreas que rodean a diversos tumores de mal pronóstico en diversas localizaciones como en el cáncer de esófago, colorrectal, oral, cutáneo, ovárico ...con altos niveles de su ARNm relacionados con mal pronóstico, presencia de metástasis y corta supervivencia (98). Por tanto, la expresión del gen MMP-11 parece estar asociada con la progresión tumoral (251). En el cáncer de mama la MMP-11 se expresa en células estromales peritumorales, y está asociada con la

progresión del tumor y metástasis (252). Los estudios de Vizoso et al demostraron que la MMP-11 se expresa preferentemente en las células del estroma peritumoral y que los altos niveles de MMP-11 se asociaron con la progresión tumoral y mal pronóstico (251). La expresión de MMP-11 ha sido observada principalmente en los fibroblastos estromales que rodean las células epiteliales malignas, lo que sugiere una promoción de la tumorigénesis de una manera paracrina, asociándose con un peor pronóstico en el cáncer de mama (98).

La MMP-11 como dijimos es expresada preferentemente por células estromales peritumorales. En la próstata, se encuentran porcentajes más altos de expresiones de MMP-11 por las células de fibroblastos de los carcinomas de próstata en comparación con los fibroblastos de la HBP (283).

En el CaP localizado tras la cirugía prostática, estudios recientes relacionan una mayor expresión estromal de MMP-11 con un aumento de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical (251). Sus niveles se correlacionan positivamente con la suma de Gleason del tumor, el estadio y la presencia de metástasis (284).

En el CaP avanzado se ha relacionado la expresión de MMP-11 con la presencia de tumores prostáticos agresivos y con una disminución en la supervivencia específica para cáncer, así niveles elevados predicen una menor supervivencia (284).

Recientemente se ha comprobado en cultivos de fibroblastos peritumorales, una mayor expresión de MMP-11 en el cáncer de próstata resistente a castración (98), mostrando que la expresión de MMP-11 por los fibroblastos fue mayor en tumores de mayor grado y cuando el PSA fue más alto, encontrándose una expresión elevada en tumores metastásicos y refractarios a la castración. Así la expresión de MMP-11 era significativamente alta en los fibroblastos asociados al cáncer de carcinomas de próstata resistentes a la castración y fibroblastos de tumores metastásicos demostrándose una alta expresión de MMP-11 (101). En los tumores avanzados, en fases de mayor agresividad tumoral o resistencia a la castración, la producción de MMP -11 por los fibroblastos resultó significativamente mayor que en los tumores no metastásicos o en fases de sensibilidad a la castración (98).

Varios autores han propuesto a la MMP-11 como un marcador pronóstico (284). Podría considerarse la MMP-11 como un potencial marcador de la presencia de tumores con gran capacidad de invasividad , así como una diana terapéutica en el cáncer de próstata avanza (251).

## 2. Hipótesis

---



Dada la incidencia y prevalencia del CaP, actualmente representa un problema de salud. Aunque el patrón de presentación de este tumor ha cambiado y se detectan más tempranamente, no se ha aclarado si ello contribuye a una mejora de la supervivencia. La aparición del PSA produjo una disminución de la mortalidad, pero la aplicación masiva de cribado ha dado lugar a un sobrediagnóstico y sobretratamiento, dado que no es un marcador específico del cáncer ni permite una predicción del comportamiento del tumor.

Actualmente, el diagnóstico del CaP se basa en el tacto rectal y/o la determinación de PSA, y estos datos, junto con los resultados histológicos de la biopsia o de la pieza de la prostatectomía se reúnen para establecer grupos de riesgo o nomogramas pronósticos. De esta manera, se han desarrollado múltiples herramientas de predicción pre y postoperatorias (tablas, nomogramas...) para intentar predecir la evolución del cáncer de próstata, destacando, por ejemplo, las tablas de Partin, los grupos de riesgo d'Amico o los nomogramas de Kattan o Briganti. Sin embargo, ninguna de estas herramientas empleadas en la fase preoperatoria o incluso en el postoperatorio, con los datos de la pieza de la prostatectomía radical, tienen una alta fiabilidad pronóstica, no siendo posible por el momento definir con precisión el pronóstico de un paciente determinado con cáncer de próstata no metastásico. Además, muchos problemas subyacen en la naturaleza de los datos que se utilizan, no siempre concluyentes, dada la dificultad del muestreo de la glándula y la heterogeneidad en la interpretación de los resultados que frecuentemente es dependiente del patólogo observador.

En el CaP se ha demostrado que, tras el proceso de iniciación, la progresión tumoral con invasión local y metástasis se ve facilitada por el estroma, estando también bajo la influencia androgénica. Existen claras evidencias que el microambiente estromal influye de una manera definitiva en el desarrollo del cáncer prostático, patología muy común en varones con una repercusión socio-sanitaria evidente. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el estroma regula el crecimiento de las células epiteliales en el cáncer de próstata son desconocidos.

Desde hace unos años se reconoce que el estroma es un inductor del crecimiento y diferenciación del epitelio glandular prostático asociado a andrógenos, existiendo un mecanismo recíproco que juega un papel central en la carcinogénesis y progresión del cáncer de próstata. Así, la existencia de los CAF ha sido recientemente descrita en el cáncer de próstata. Igualmente, a partir de un estudio previo, hemos observado que algunos factores diferenciales estarían sobreexpresados en presencia de este estroma reactivo tumoral, analizando fibroblastos procedentes del estroma tumoral de pacientes

con cáncer de próstata. Además, el estroma tiende a ser genéticamente más estable que el epitelio, lo cual puede ser de interés en una patología que presenta una enorme heterogeneidad, no solo en diferentes individuos sino en la propia glándula afectada, lo que puede facilitar el hallazgo de marcadores más fiables y reproducibles.

La sobreexpresión del receptor androgénico epitelial maligno, junto a la pérdida de reactividad del mismo en el estroma periférico, se ha asociado a carcinomas de alto grado, y a una elevada tasa de recidiva tras prostatectomía radical, pudiendo reaparecer dicha expresión meses después del inicio de la castración.

Parece cada vez más claro que las señales androgénicas favorecerían el crecimiento de las células epidérmicas prostáticas a través de la modulación de diferentes factores de crecimiento como el FGF o el VEGF y el PDGF. Se ha demostrado experimentalmente que la supresión de la señalización del TGF- $\beta$  puede retrasar la progresión de tumores andrógeno-independientes en ratones. En la superfamilia de los Factores de Crecimiento Fibroblásticos, el FGF-7 interactúa con los andrógenos y el receptor androgénico en la próstata, habiéndose encontrado sobreexpresados en los carcinomas prostáticos. Además, la sobreexpresión de FGF-10 en los fibroblastos de la próstata induce experimentalmente la formación de PIN multifocal en el epitelio adyacente.

Diversos autores han demostrado una sobreexpresión de algunos genes codificadores de las metaloproteinasas de matriz, que estarían implicados en la degradación de las membranas basales en el cáncer de próstata en ratas. Específicamente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de diversas MMPs como MMP-9 o TIMP-1 (inhibidor tisular de la MMP-1) en los fibroblastos estromales se asocia a un incremento de la probabilidad de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical. Además, parece que la expresión de MMP-2 por los fibroblastos se relacionaría inversamente con la recidiva tras cirugía radical, y la de MMP-9 directamente con la misma. Este diferente significado pronóstico está en controversia con resultados de grupos que afirman una mayor expresión de MMP-2 en cáncer de próstata. No obstante, podría relacionarse con el momento de mayor expresión durante el proceso de carcinogénesis, más precoz para MMP-2 y más tardía para MMP-9. Por otro lado, la MMP-11 o estromalisina-3 se encuentra en grandes porcentajes en el estroma de cáncer de próstata, encontrándose sobreexpresada en pacientes con recidiva bioquímica tras prostatectomía radical.

El cultivo de células procedentes de próstata humana tiene ventajas evidentes, destacando, además de un estudio más específico de las células afectadas, la posibilidad

de contar con una reserva celular en la que pueden realizarse diferentes determinaciones, incluso en momentos posteriores al proceso evolutivo de la enfermedad que se analiza y la de realizar co-cultivos con diferentes líneas celulares epiteliales. En la Unidad de Investigación del Hospital de Jove se ha optimizado la técnica de extracción de fibroblastos y hemos comprobado la viabilidad del cultivo celular de los fibroblastos prostáticos en nuestro laboratorio.

Por lo anteriormente descrito, hemos planteado hacer un estudio prospectivo en una serie de pacientes sometidos a biopsia múltiple prostática por sospecha de cáncer de próstata, con el objetivo principal de poder estudiar y comparar las características del estroma de las diferentes áreas de la zona periférica prostática en pacientes que finalmente sean diagnosticados de una neoplasia, diferenciando las zonas con tumor de las que no lo tienen. El estudio de los factores secretados en el estroma y seleccionados a partir de nuestros trabajos anteriores permitirá conocer rasgos diferenciales de la carcinogénesis prostática y del desarrollo de la HPB. Pero también podrá tener una translación a la clínica si se consiguen identificar marcadores pronósticos estromales, así como moléculas características de ambos procesos que puedan expresarse en fases iniciales pudiendo, finalmente, aportar datos sobre potenciales dianas terapéuticas. Aunque el número de casos que debe ser limitado por la complejidad técnica de los cultivos celulares, y los obstáculos para su logro (contaminación o ausencia de celularidad) obtuvimos una serie suficiente para responder a los objetivos que se expresan posteriormente.

## **3. Objetivos**

---



- 1-** Analizar la expresión del receptor androgénico (**RA**), de los factores de crecimiento (**FGF-2, FGF-7, FGF-10, TGF- $\beta$ 1, HGF y PDGF-B**), y de las proteínas implicadas en la invasión (**MMP-2, MMP-9 y MMP-11**) por los fibroblastos peritumorales en relación con las características clínico-patológicas en tumores localizados.
  
- 2-** Determinar potenciales asociaciones de la expresión de dichos factores en tumores localizados.
  
- 3-** Comparar su expresión en tumores localizados en relación con los carcinomas metastásicos, y ambos con la del tejido no tumoral.
  
- 4-** Estudiar su posible utilidad como potenciales marcadores de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical en tumores localizados.

## **4. Material y métodos**

---



## **4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Para alcanzar los objetivos propuestos, se planteó un estudio de obtención de muestras prospectivo, donde se analizan muestras de pacientes con cáncer de próstata. Se obtuvieron muestras de los diferentes grupos pronósticos dentro de los tumores localizados, así como muestras de pacientes metastásicos sin haber iniciado tratamiento de privación androgénica. Se compararon los resultados con los de las muestras no tumorales alejadas del tumor (control sano).

Posteriormente a obtener las muestras mediante biopsia transrectal de próstata, se enviaron al laboratorio para cultivar y aislar los fibroblastos. En ellos realizamos análisis de distintos marcadores moleculares con intención de comparar su valor en los diferentes grupos de pacientes.

El seguimiento se realizó en la consulta de Urología según los protocolos correspondientes a las guías de la Asociación Europea de Urología.

### **4.1.1 Población de estudio**

#### **Criterios de inclusión**

- Pacientes con sospecha cáncer de próstata localizado. Tras confirmar el diagnóstico se sometieron a prostatectomía radical con intención curativa.
- Pacientes con tumores metastásicos diagnosticados mediante pruebas de imagen. Se biopsiaron para confirmar histológicamente el diagnóstico previamente a iniciar un tratamiento. Una vez confirmado se inicia tratamiento con deprivación androgénica.

#### **Criterios de exclusión**

- Diagnóstico previo de Cáncer de próstata, así como tener historia previa de otras neoplasias malignas o terapia neoadyuvante.
- Desarrollo de un segundo tumor primario.
- Insuficiente cantidad de tejido para la obtención de células para cultivo.

## 4.1.2 Métodos de obtención de muestras

### Biopsia de próstata

Se realizó la extracción de tejido prostático mediante punción guiada por ecografía transrectal para su estudio anatomopatológico, tanto de biopsia inicial como repetida ante la persistencia de sospecha clínica. Como preparación se entregó a los pacientes un enema rectal para aplicar la noche previa al procedimiento y una profilaxis antibiótica con Ciprofloxacino 500 mg un comprimido cada 12 horas durante 5 días, fosfomicina 3g dos dosis o Cefuroxima 500 mg 4 dosis, según el centro y el año de realización. Se inyectó al inicio del procedimiento lidocaína en el ángulo vesículo-prostático y en el ápex prostático.

Como norma general, se tomaron 12 cilindros de la zona periférica prostática, dos muestras de cada sextante; base, medial y ápex del lóbulo derecho y del izquierdo. Adicionalmente, se tomaron otros 6 cilindros para el presente estudio de cada área.

Por tanto, de cada muestra prostática había 3 cilindros, dos para diagnóstico anatomopatológico y otro para cultivo celular. Todas estas muestras se recogieron en medios de cultivo apropiados para ser trasladados en pocas horas al laboratorio donde fueron procesadas.

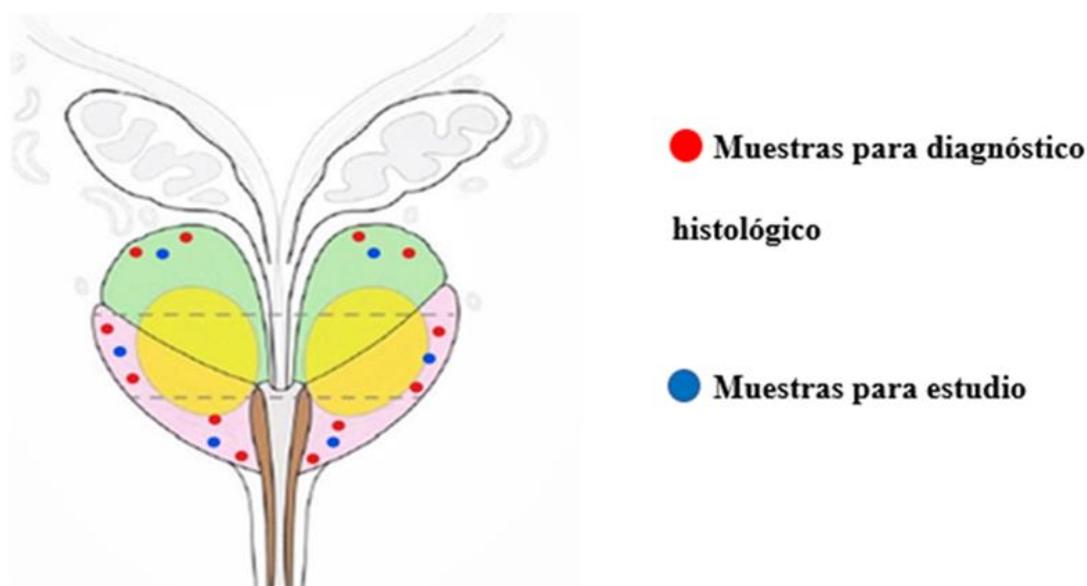


Figura 8. Obtención de muestras pareadas para diagnóstico y estudio

### **Prostatectomía radical**

Se realizó por vía abierta o laparoscópica según las técnicas estandarizadas. Se realizó una linfadenectomía extendida (desde la fosa obturatriz como límite inferior, hasta la bifurcación de las iliacas, medialmente hasta el nervio obturador y lateralmente hasta el nervio genitofemoral), en los casos con PSA mayor de 10 ng/ml y/o con un Gleason en la muestra de la biopsia igual o mayor a siete en los que el nomograma de Briganti indicaba un riesgo > 5% de afectación ganglionar.

#### **4.1.3 Selección de las muestras válidas para el estudio**

Finalmente, para este estudio se obtuvieron 45 muestras válidas (n: 45), de los cuales se analizaron 30 casos correspondientes a estroma neoplásico. Los casos con cáncer de próstata se intentaron seleccionar de acuerdo con diferentes grupos de riesgo para incluir tumores con diferente agresividad clínica. De todas las muestras, 15 correspondieron a estroma no tumoral, obtenidos de pacientes sometidos a biopsia múltiple, seleccionando las zonas sin tumor más alejadas de cualquier foco neoplásico.

Inicialmente se recogieron muestras de un mayor número de pacientes (88 casos). Algunos hubo que desecharlos por contaminación durante la obtención de esta o durante su procesado en el laboratorio. En el caso de los pacientes tumorales, se recogieron muestras de múltiples pacientes para seleccionar de manera equilibrada según los grupos de riesgo y con la confirmación de los datos de la pieza quirúrgica de prostatectomía radical. Los casos que no cumplen los criterios de selección fueron congelados para posibles estudios posteriores.

#### **4.1.4 Obtención de los datos clínicos**

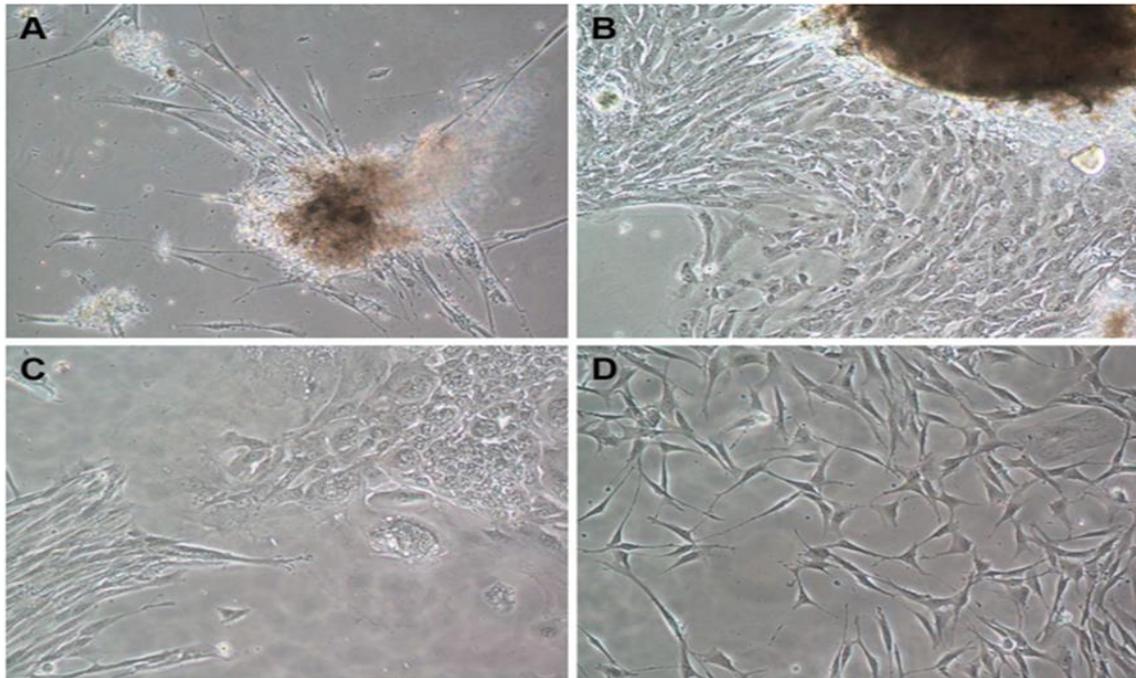
Los datos clínicos y patológicos, tanto de la biopsia tumoral y de la pieza de prostatectomía radical fueron recogidos en una base de datos específica, en la que además se incluyeron parámetros del seguimiento para analizar la evolución de los pacientes con cáncer de próstata localizado tras el tratamiento radical que podrán ser evaluados en un estudio de supervivencia para analizar el tiempo libre de recidiva bioquímica.

De esta manera, en todos los casos se recogieron los datos del paciente como la edad, el volumen prostático y el valor de PSA expresado en ng/ml. En cuanto a los parámetros tumorales se recogió el Gleason obtenido en la biopsia (Gleason primario y Gleason secundario), el estadio clínico –cT- y si había tumores múltiples. Se distinguió

en ellos la localización del tumor del tejido sano lejano al tumor que sirvió como control (tejido sano no tumoral). Una vez realizado el tratamiento con intención curativa, en el caso de ser sometidos a prostatectomía radical, se registró de nuevo el Gleason primario y secundario, así como el estadio patológico –pT-, bordes afectados y afectación ganglionar patológica en caso de existir –pN-.

## **4.2 TÉCNICA DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS**

Las muestras se colocaron en placas de 12 pocillos e incubadas con colagenasa tipo I (1,25 mg/ml) en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) durante 48 horas. Tras la digestión las células fueron lavadas con PBS y colocadas de nuevo en placas, y cada 3 o 4 días se cambiaba el medio, hasta que las células eran semiconfluentes y es en este punto del proceso cuando se seleccionaron los fibroblastos por trypsinización diferencial. Los cultivos puros de fibroblastos se expandieron de nuevo en medio DMEM-F12 con 10% de FBS y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80%. La pureza del cultivo de los fibroblastos será confirmada por la siguiente caracterización: vimentina y alfa-actina positiva y desmina negativa en el estudio inmunohistoquímico y por citometría de flujo con anticuerpos CD90 clon AS02.



**Figura 9.** Imágenes de los cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento: A) 24 a 72 horas de aislamiento. B) Una semana después del aislamiento. C) Dos tipos celulares morfológicamente diferentes: las células en forma de huso corresponderían a los fibroblastos mientras que las células redondeadas corresponderían a células epiteliales o tumorales. D) Cultivo de fibroblastos puros (101).

#### 4.2.1 Determinaciones moleculares

Se analizaron los factores de origen estromal que por el momento han mostrado que interactúan con el epitelio en el desarrollo y progresión tumoral, y que tienen un mayor potencial para ser considerados como marcadores estromales de cáncer de próstata. En un estudio de nuestro grupo, hemos determinado algunos factores que se expresan en el estroma tumoral de forma diferente al estroma no tumoral de la zona periférica de la glándula prostática en un número limitado de casos. Por todo ello, se han seleccionado los siguientes factores:

- **Receptor androgénico**
- **FGF-2, FGF-7 y FGF-10**
- **TGF- $\beta$**
- **HGF**
- **PDGF-B**
- **MMP-2, MMP-9 y MMP-11**

Los estudios de expresión génica se diseñaron y se llevaron a cabo en placas (Roche®) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un kit de extracción para obtener el ARN total “RNeasy Mini kit” (Qiagen), incluyendo un tratamiento con DNAsa. La integridad y la concentración del ARN total obtenido fueron determinadas mediante un espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop® ND-1000. La primera hebra de ADNc se consiguió utilizando el kit de síntesis “Transcriptor First Strand cDNA” (Roche®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de genes fueron evaluados por PCR en tiempo real empleando la celdilla “Real Time Ready Custom panel” (Roche®). Los niveles de ARNm se midieron en un ciclador de luz 480 II (Roche®), en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y un segundo a 72°C. Las placas contienen los cebadores y sondas específicas para los siguientes factores y para tres genes de referencia.

**Tabla 7. Factores estromales analizados en el estudio**

<b>Factor</b>	<b>Referencia</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Tipo de gen</b>
RA	102544	Receptor androgénico	Receptor hormonal
FGF-2	118274	Factor de crecimiento de fibroblastos 2	Factor de crecimiento
FGF-7	113109	Factor de crecimiento de fibroblastos 7	Factor de crecimiento
FGF-10	118274	Factor de crecimiento de fibroblastos 10	Factor de crecimiento
TGFβ	101210	Factor de crecimiento transformante β	Factor de crecimiento
HGF	108357	Factor de crecimiento hepatocítico	Factor de crecimiento
PDGFb	110713	Factor de crecimiento derivado de plaquetas β	Factor de crecimiento
MMP-2	103899	Metaloproteinasa 2	Invasión
MMP-9	139820	Metaloproteinasa 9	Invasión
MMP-11	103163	Metaloproteinasa 11	Invasión

#### **4.2.2 Aspectos éticos y de confidencialidad**

Dado que el estudio supone un incremento del número de muestras durante la biopsia y una manipulación de estas, se ha elaborado un documento específico de consentimiento informado que ha sido valorado positivamente y aceptado por el Comité Ético de Investigación del Principado de Asturias (Anexo I).

### 4.2.3 Estudio estadístico

Además del análisis descriptivo de las características clínico-patológicas, se analizaron las expresiones moleculares obtenidas mediante PCR (valor cuantitativo respecto al calibrador basal antes referido). Se emplearon test paramétricos (estimación de las medias y comparación de medias) cuando la distribución fue normal.

Para las determinaciones moleculares, dado el pequeño tamaño de la muestra y que en algunas de ellas la distribución no fue normal (test de Kolmogorov-smirnov y Shapiro-Wilk), se emplearon pruebas no paramétricas con determinación de medianas, rangos intercuartiles, U de Mann-Whitney, de Kruskal-Wallis y correlación de Spearman.

El análisis de supervivencia (tiempo hasta la recidiva bioquímica) se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, lo cual permitió su representación gráfica. Posteriormente, se realizó la prueba del rango logarítmico (log-rank), comparando de forma univariante las curvas de supervivencia y evaluando así el efecto de cada uno de los factores pronósticos sobre el tiempo hasta la recidiva bioquímica. Por último, consideramos las variables que fueron significativas en el análisis univariante como covariantes en la prueba del modelo de riesgos proporcionales de Cox, con la intención de determinar el efecto conjunto de los factores pronósticos que resultan significativos de forma independiente y cuantificar los riesgos relativos e intervalos de confianza (IC) del 95% de recurrencia y progresión. Se eligió el procedimiento por pasos hacia delante, determinando el estadístico de Wald, que introduce y selecciona variables en un orden que depende del porcentaje de la varianza. Se consideró estadísticamente significativa una p valor menor de 0,05. Para el análisis estadístico se empleó el programa IBM® SPSS® Statistics versión 25.

## **5. Resultados**

---



## 5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE

Finalmente se tomaron 45 muestras de un total de 30 pacientes con tumores de próstata sometidos a biopsia transrectal. De ellos, 6 fueron metastásicos (M+) que aún no habían recibido tratamiento en el momento de la biopsia, y 24 pacientes tenían tumores localizados. Además, en 15 casos se recogieron muestras de tejido normal, todos ellos procedentes del tejido no neoplásico lejano al tumor obtenido de las biopsias múltiples de pacientes con neoplasias localizadas.

La edad media fue de 67,73 (54-89) años, siendo la de los tumores localizados y metastásicos de 67,1 y 70,3 años, respectivamente. El volumen prostático medio fue de 37cc (25-90). La mediana de PSA en tumores localizados fue de 6 ng/ml (3,6-39), con gran variación en los metastásicos, con una mediana de 582,9 ng/ml (75-3971).

Las muestras obtenidas mediante biopsia de próstata transrectal (n:30) se clasificaron según la suma de Gleason. La mayoría de los pacientes presentaron un Gleason score de 7 (n:11), de 8 (n:8) y de 6 (n:7); los scores de Gleason menos frecuentes fueron el 10 (n:1) y 9 (n: 3).

En los tumores localizados se presentaron las sumas de Gleason más bajas con siete casos de Gleason 6 y once casos Gleason 7. Además hubo 5 tumores con suma de Gleason de 8 (3+5) y uno de 9 (4+5) (tabla 8).

**Tabla 8. Score Gleason en la biopsia de los tumores localizados**

SCORE GLEASON	6	7	8	9	TOTAL
Nº CASOS	7	11	5	1	24
%	29,2	45,8	20,8	4,2	100

Los 24 pacientes con tumores localizados se sometieron a prostatectomía radical como tratamiento primario. Se comparó el Gleason de la biopsia con el de la pieza de prostatectomía radical obteniendo los siguientes resultados (tabla 9), como se puede observar hubo 7 casos infradiagnosticados y 4 sobre diagnosticados en las biopsias.

**Tabla 9. Concordancia entre los resultados de la biopsia y la pieza de prostatectomía**

		Gleason pieza				
		3+3	3+4	3+5	4+3	4+5
Gleason biopsia	3+3	3	2	2		
	3+4	2	3	1	1	
	3+5			4		1
	4+3		1		3	
	4+5	1				

Finalmente, empleamos el Gleason score de la pieza de prostatectomía en los tumores localizados y el de la biopsia en los metastásicos que, tras el estudio histológico fueron sometidos a privación androgénica. Sin embargo, para realizar los análisis estadísticos, empleamos la clasificación ISUP según la cual, los tumores se distribuyeron de la siguiente manera (tabla 10):

- Localizados (sometidos a prostatectomía radical). 6 pacientes se clasificaron como grupo 1 (SG: 3+3), otros 6 como grupo 2 (SG: 3+4), 4 como grupo 3 (SG: 4+3), 7 como grupo 4 (SG: 8) y 1 en el grupo 5 (SG: 4+5)
- Metastásicos (sometidos a privación androgénica). 3 pacientes tenían tumores del grupo 4 (SG: 8) y otros 3 del grupo 5 (SG: 9 y 10)

De los 24 casos de pacientes con tumores localizados, 10 presentan tumores múltiples en los que se recogió muestra de ambos tumores, tejido tumoral 1 y tejido tumoral 2. Se realizó un análisis Chi<sup>2</sup> para valorar diferencias significativas entre el tipo de tumor, agrupándolos en 2 categorías, ISUP 1-3, ISUP 4-5. No se encontraron diferencias significativas (p:0,536), lo que nos permitió analizar únicamente la muestra del tumor más voluminoso en la pieza de PR, como el correspondiente a cada caso.

**Tabla 10. Distribución de casos según la ISUP**

		<b>Prostatectomía</b>	<b>M+</b>
<b>ISUP</b>	<b>1</b>	6	
	<b>2</b>	6	
	<b>3</b>	4	
	<b>4</b>	7	3
	<b>5</b>	1	3

La distribución por estadio se llevó a cabo a través de las muestras de PR (pT). Hubo pT2a (n 4), pT2c (n 14), pT3a (n 6) y ningún pT3b como se refleja en la siguiente tabla (tabla 11).

**Tabla 11. Estadios pT de las piezas de prostatectomía**

<b>ESTADIO pT</b>	<b>pT2a</b>	<b>pT2b</b>	<b>pT3a</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Nº CASOS</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>24</b>

Aquellos pacientes que en el preoperatorio mostraron riesgo elevado de afectación extraprostática, en base a los parámetros clínicos (valorándose mediante nomograma de Briganti), fueron sometidos a linfadenectomía durante la intervención. En total de los 24 pacientes con prostatectomía radical, 7 fueron sometidos a linfadenectomía, resultando con afectación 2 pacientes (29,16%) siendo ambos pTN1.

Los tumores localizados tuvieron una mediana de seguimiento de 70 meses (17-113), de éstos, 6 pacientes presentaron recidiva bioquímica, tres de cada grupo pronóstico (bajo/medio vs alto riesgo) con una mediana de 28 meses (10-60) siendo sometidos a

tratamiento con radioterapia sobre el lecho quirúrgico y ganglios pélvicos. Actualmente no se ha detectado una recidiva bioquímica tras la irradiación, con una mediana de seguimiento total de 67 meses (17-76) en estos 6 casos. En los tumores metastásicos, la mediana de seguimiento fue de 26 meses (12-78).

## **5.2 DETERMINACIÓN DE MARCADORES**

En este apartado se analiza la expresión de los marcadores del estudio, comparando cómo varía esta expresión según las características clínico-patológicas de los pacientes. Los marcadores a estudio descritos previamente son:

- Receptor androgénico
- **FGF-2, FGF-7 y FGF-10**
- **TGF- $\beta$**
- **HGF**
- **PDGF-B**
- **MMP-2, MMP-9 y MMP-11**

### **5.2.1 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata localizado**

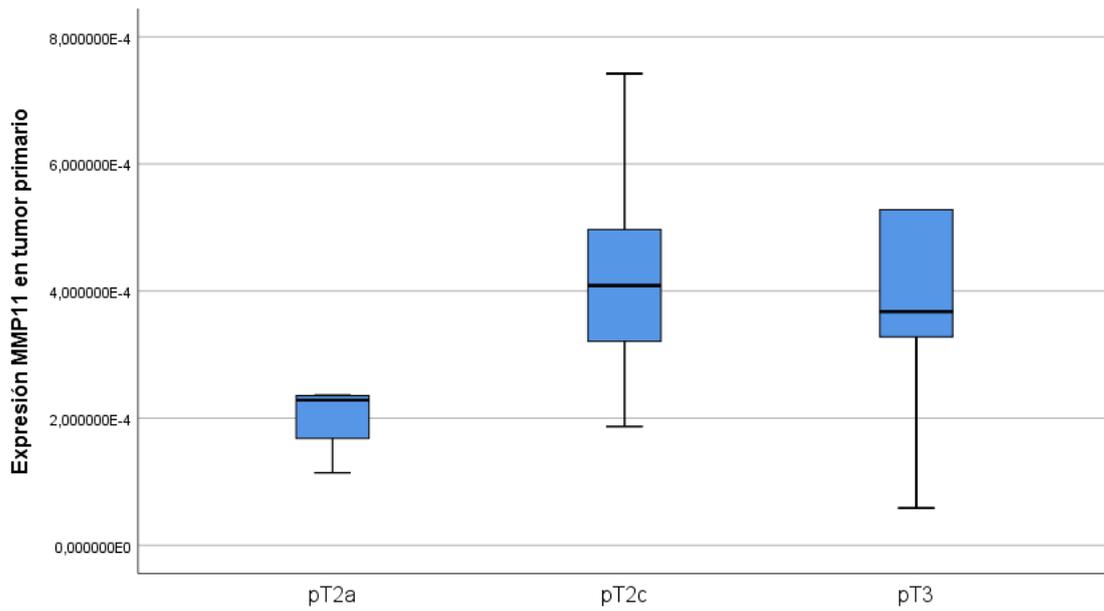
#### **Expresión de marcadores de fibroblastos de tumores localizados según PSA**

No se demostró una correlación estadística entre el nivel de PSA y la expresión de ninguno de los marcadores de estudio.

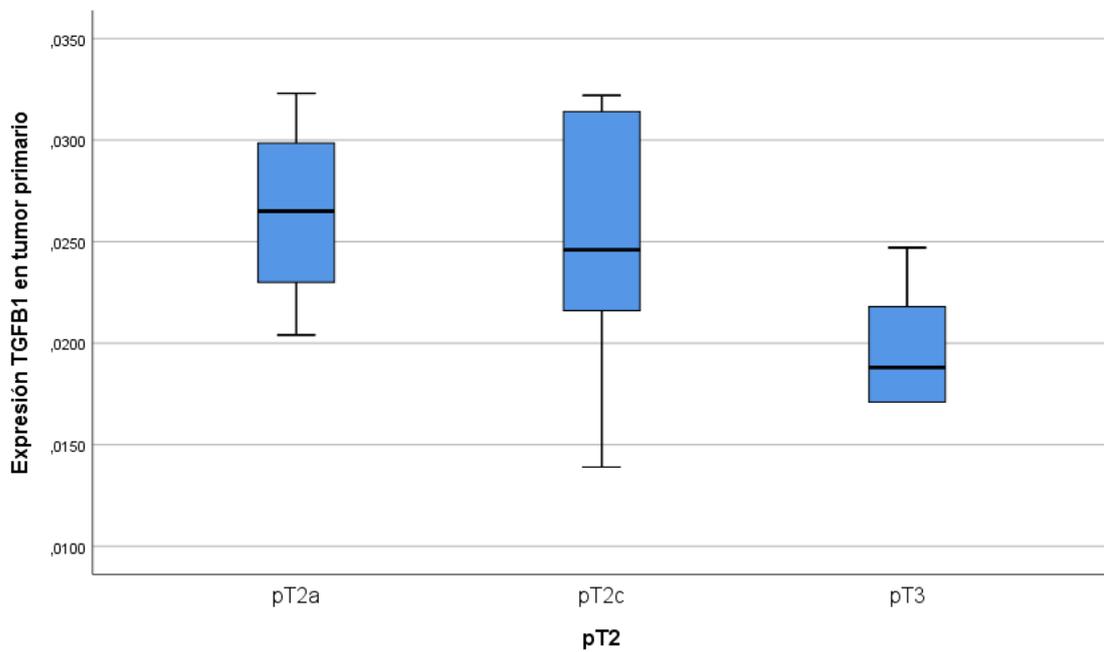
#### **Expresión de marcadores de fibroblastos de tumores localizados según estadio**

En el grupo de tumores localizados, se comparó mediante la prueba de Kruskal Wallis (no paramétrica) la expresión de los diferentes marcadores a estudio según el estadio tumoral patológico (prostatectomía radical).

Se observaron diferencias significativas en los marcadores **MMP-11** ( $p=0,037$ ) y **TGF- $\beta$ 1** ( $p=0,046$ ). Se objetivó que, a mayor estadio tumoral, mayor expresión de MMP-11 (Figura 10) e, inversamente, ocurre con TGF- $\beta$ 1, puesto que, con estadios más avanzados, se produce una disminución de la expresión de este factor (Figura 11).



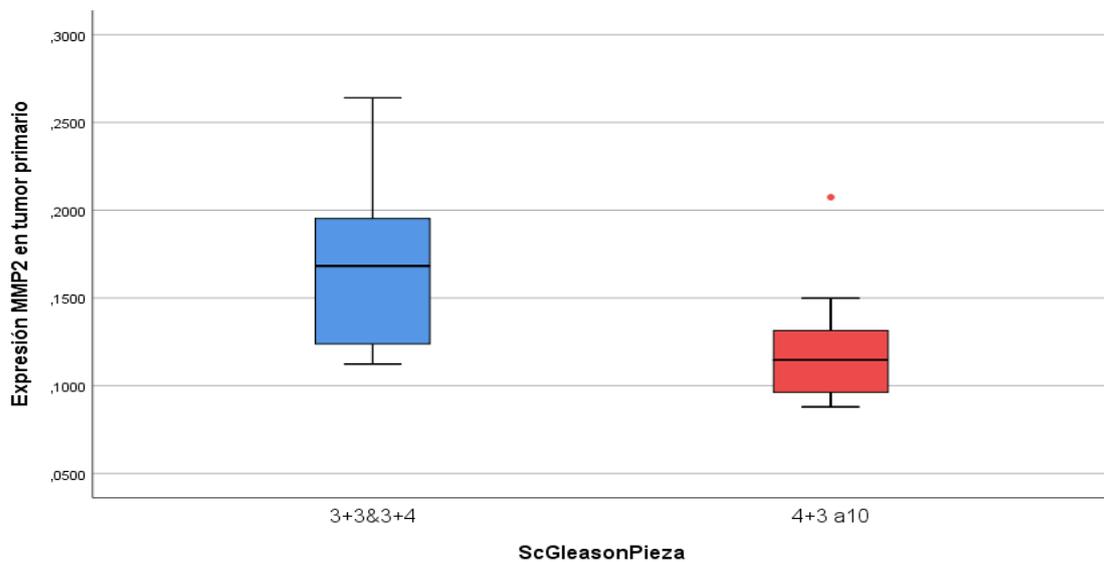
**Figura 10. Expresión de MMP-11 en relación con el estadio pT (p= 0,037)**



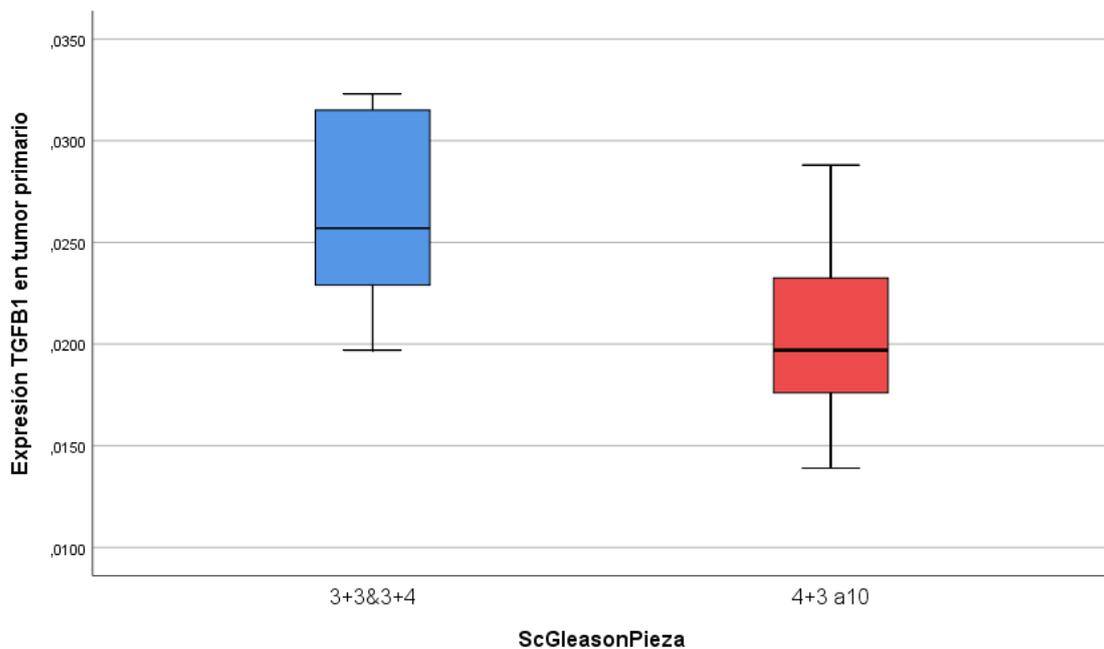
**Figura 11. Expresión de TGF-β1 en los CAF según el estadio pT (p= 0,046)**

### **Expresión de marcadores de fibroblastos de tumores localizados según ISUP (grado)**

Empleamos la misma metodología para el análisis del grado de la pieza de prostatectomía, agrupando los tumores en 2 grupos ISUP: menor de 3 (suma de Gleason de 3+3 y 3+4), que incluyó 12 casos; e ISUP de 3 o mayor (suma de Gleason de 4+3 y mayor), con otros 12. Se observaron diferencias significativas en la expresión de **MMP-2** ( $p=0,007$ ) y **TGF- $\beta$ 1** ( $p=0,005$ ). Con ambos marcadores se objetivó que, a mayor grado, se produce una disminución de la expresión de estos factores (Figura 12) (Figura 13).



**Figura 12. Expresión de MMP-2 según el Grado tumoral ( $p=0,007$ )**

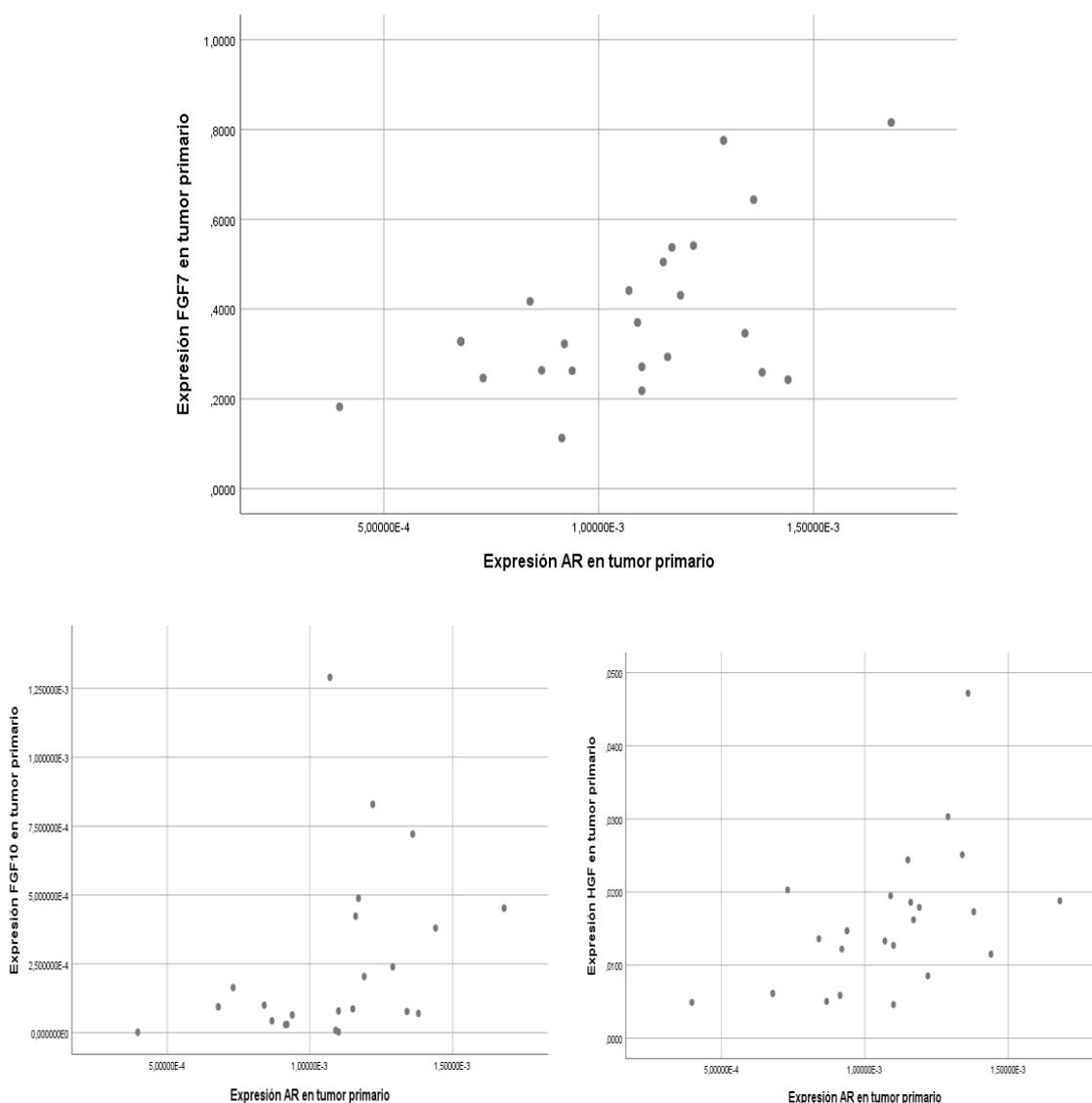


**Figura 13. Expresión de TGF- $\beta$ 1 con relación al grado tumoral ( $p=0,005$ )**

## 5.2.2 Correlación en la expresión de los diferentes marcadores estudiados

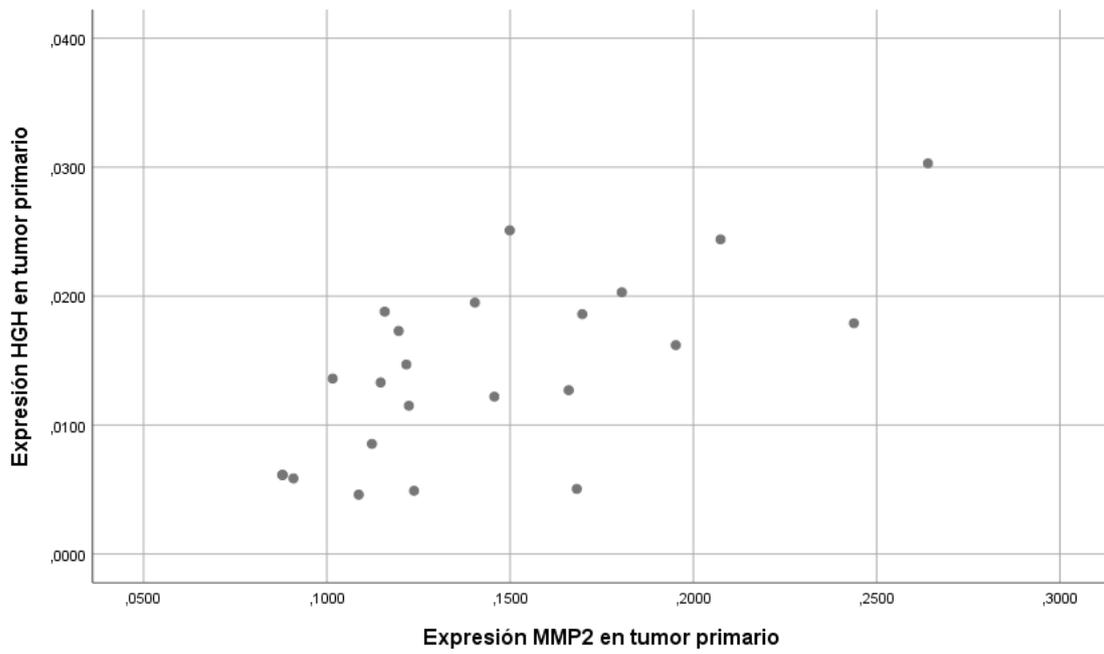
Encontramos una correlación significativa y directamente proporcional en las expresiones de:

- **RA** con las de **FGF-7** ( $p= 0,035$ ), **FGF-10** ( $p= 0,023$ ) y **HGF** ( $p= 0,08$ ) (Figura 14).
- **FGF-7** con las de **FGF-10** ( $p= 0,000$ ) (Figura 15) y **HGF** ( $p= 0,008$ ) (Figura 16).
- **HGF** con la de **MMP-2** ( $p= 0,001$ ) (Figura 17).
- **MMP-9** con la de **TGF- $\beta$ 1** ( $p= 0,041$ ) (Figura 18).

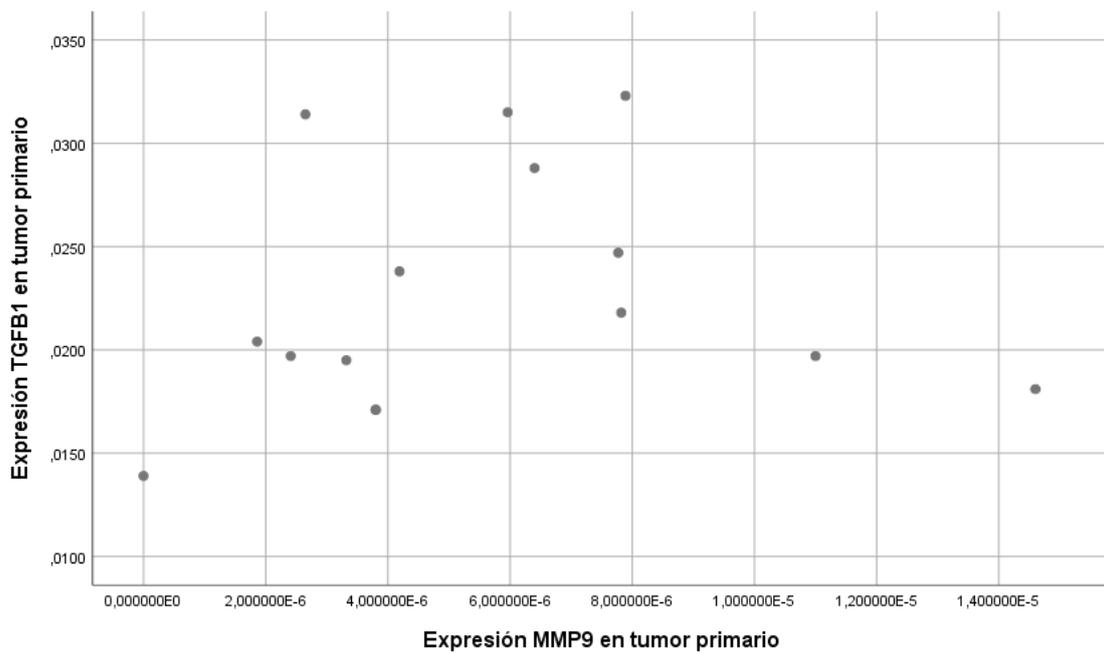


**Figura 14. Correlaciones entre la expresión de RA con las de FGF-7 ( $p= 0,035$ ), FGF-10 ( $p= 0,023$ ) y HGF ( $p= 0,08$ )**





**Figura 17. Correlaciones entre MMP-2 y HGH (p= 0,001)**



**Figura 18. Correlaciones entre las expresiones de MMP-9 con TGF-β1(p= 0,041)**

### 5.2.3 Relación de la expresión de los marcadores en tejido tumoral y no tumoral

En pacientes con cáncer de próstata localizado se observaron aumentadas las expresiones de **FGF-7** ( $p=0,000$ ) (Figura 19), **MMP-2** ( $p=0,000$ ) (Figura 20), y **MMP-11** ( $p=0,000$ ) (Figura 21), respecto al tejido prostático no tumoral. Por el contrario, disminuyeron su expresión respecto al tejido normal **FGF-10** ( $p=0,000$ ) (Figura 22) y **MMP-9** ( $p=0,000$ ) (Figura 23).

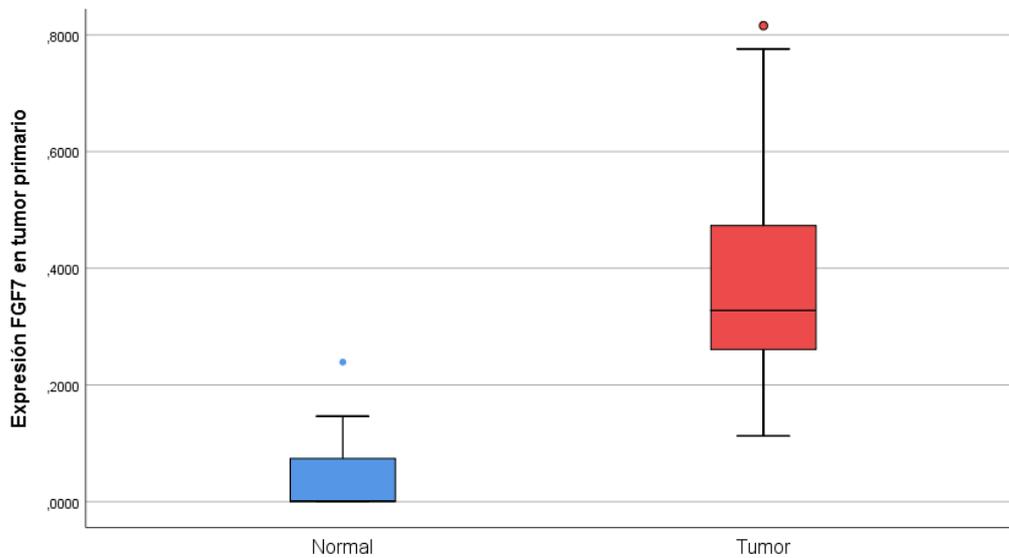


Figura 19. Aumento de expresión de FGF-7 en los tumores localizados ( $p=0,000$ )

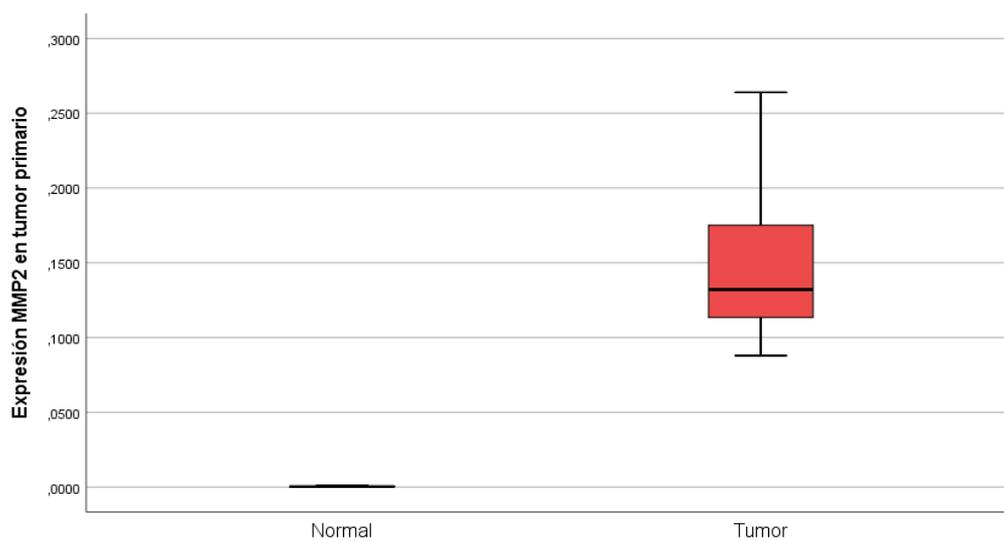
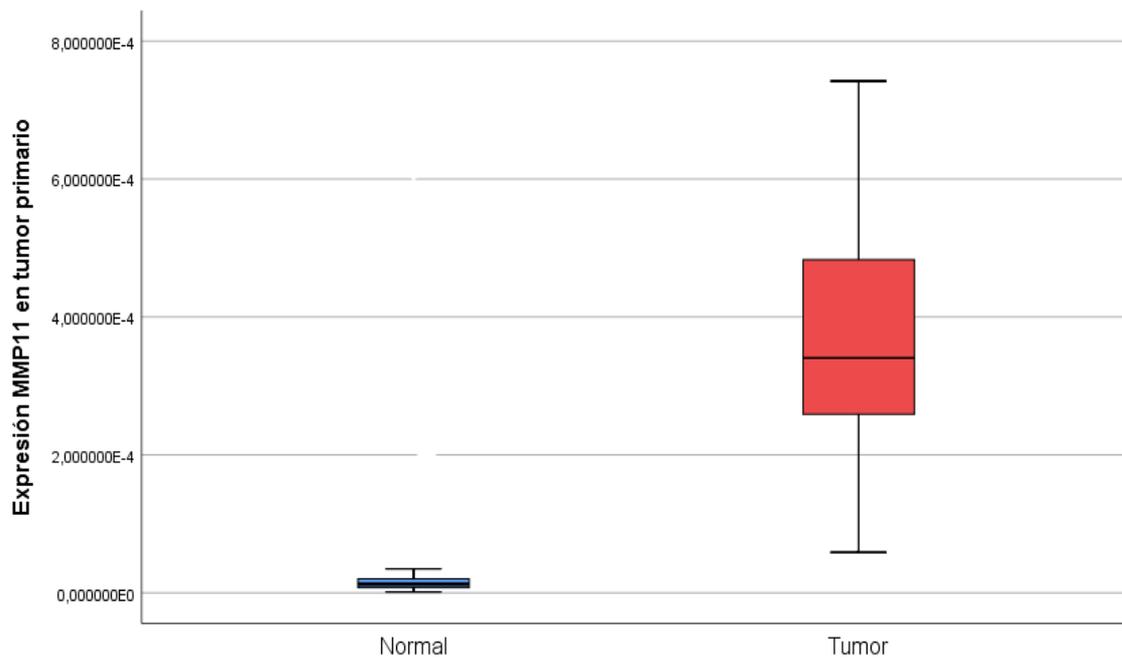
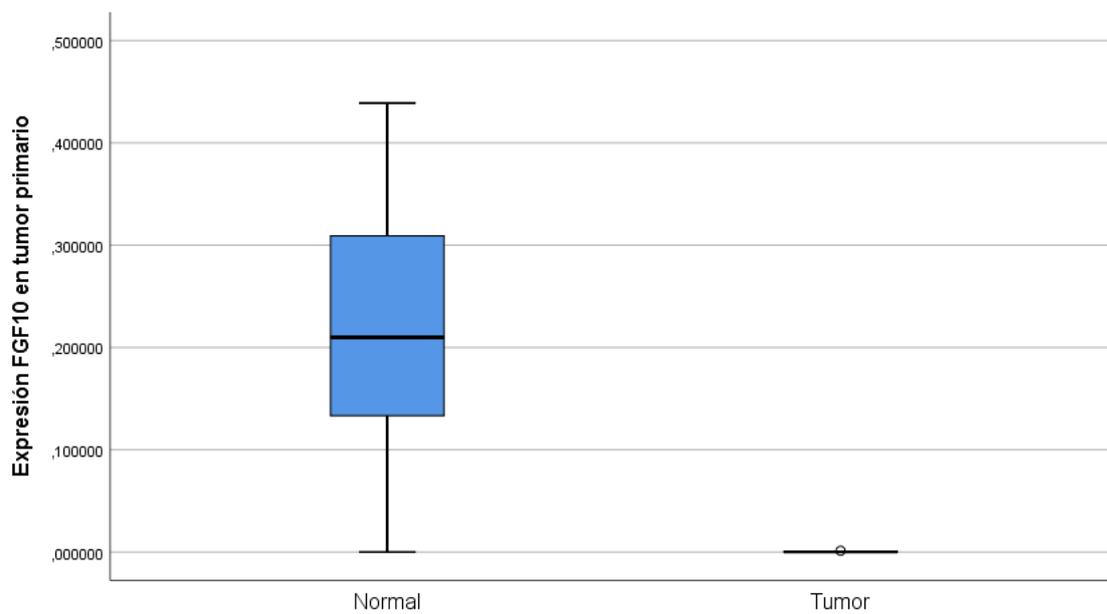


Figura 20. Sobreexpresión de MMP-2 en tumores localizados ( $p=0,000$ )



**Figura 21. Sobreexpresión de MMP-11 en tumores localizados frente a tejido normal (p=0,000)**



**Figura 22. Disminución de la expresión de FGF-10 en tumores localizados (p=0,000)**

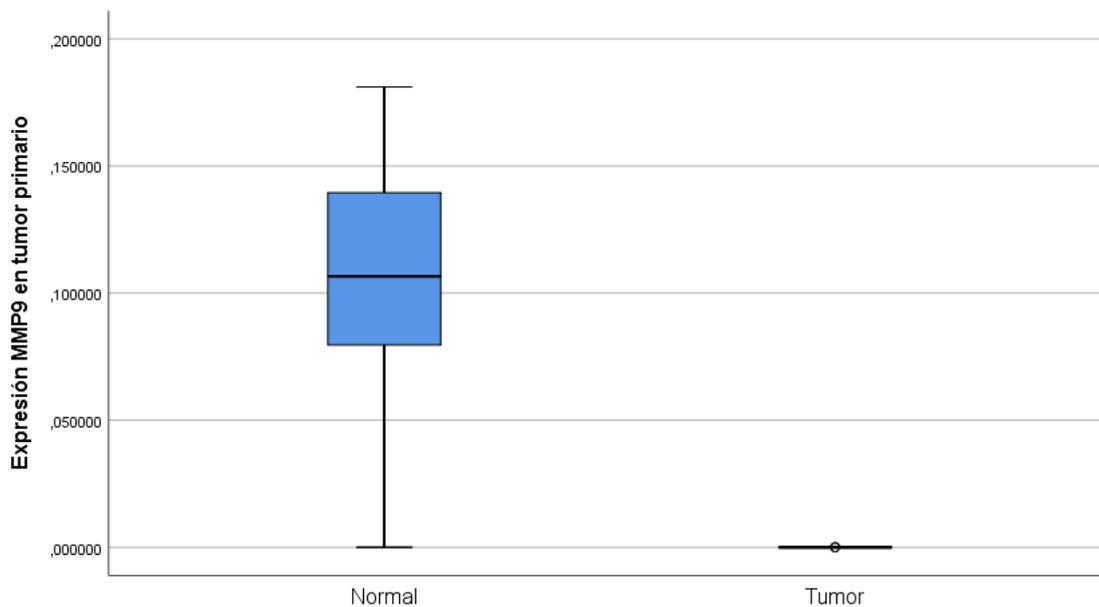


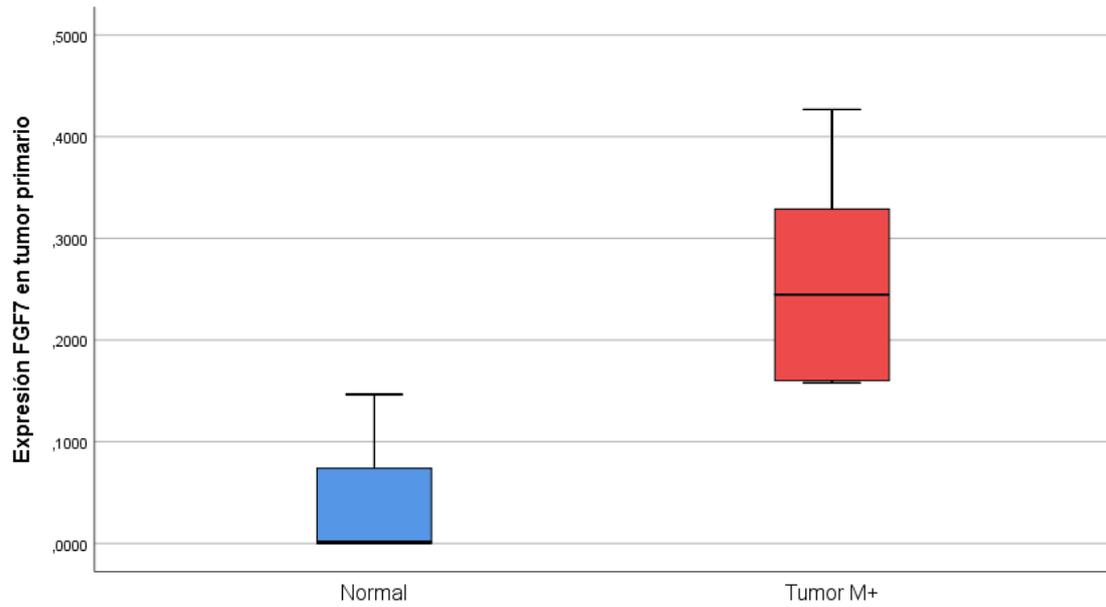
Figura 23. Disminución de la expresión de MMP-9 en tumores localizados ( $p=0,000$ )

#### 5.2.4 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata metastásico

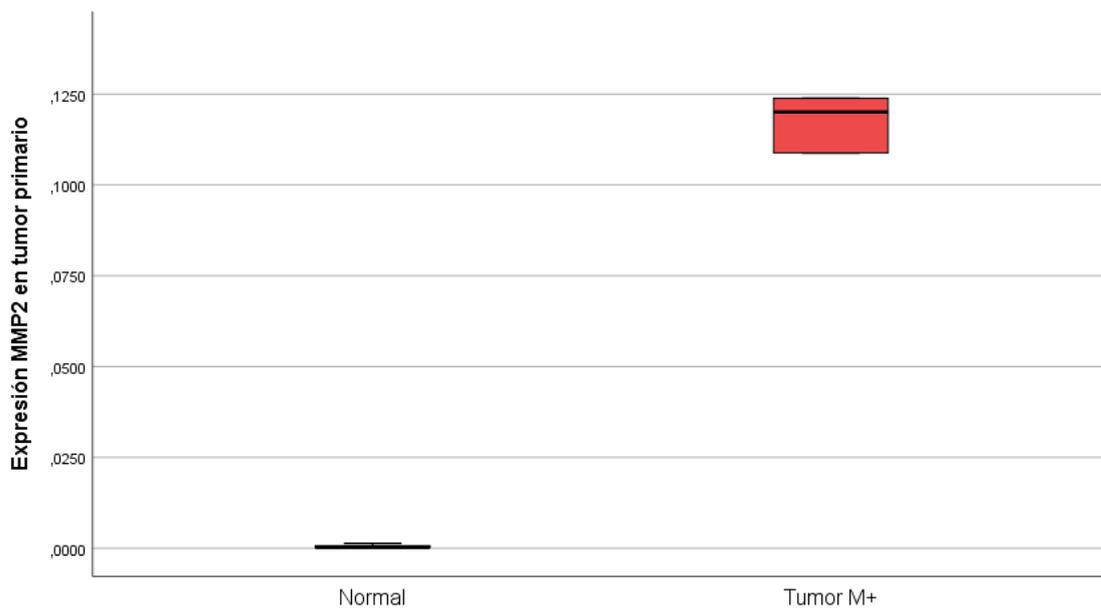
Dado el limitado número de pacientes en este grupo, no se analizaron los aspectos referentes a la asociación con los parámetros clínicos ni entre los propios marcadores. Se estudió la relación de los factores entre los tejidos normal, tumor localizado y metastásico, con los siguientes resultados:

En pacientes con cáncer de próstata metastásico, se encontraron aumentadas las mismas expresiones que en los tumores localizados, es decir las de **FGF-7** ( $p=0,000$ ) (Figura 24), **MMP-2** ( $p=0,000$ ) (Figura 25), y **MMP-11** ( $p=0,000$ ) (Figura 26). Por el contrario, disminuyeron su expresión respecto al tejido normal **FGF-10** ( $p=0,000$ ) y **MMP-9** ( $p=0,000$ ), al igual que lo descrito previamente en los tumores localizados (Figura 27).

No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos, lo cual implica, por un lado, que son capaces de diferenciar la presencia de una neoplasia respecto al tejido normal, pero no si el tumor está confinado en la glándula o es metastásico.



**Figura 24. Expresión de FGF-7 en tumores metastásicos frente a tejido normal (p=0,000)**



**Figura 25. Sobreexpresión de MMP-2 en el tumor metastásico (p=0,000)**

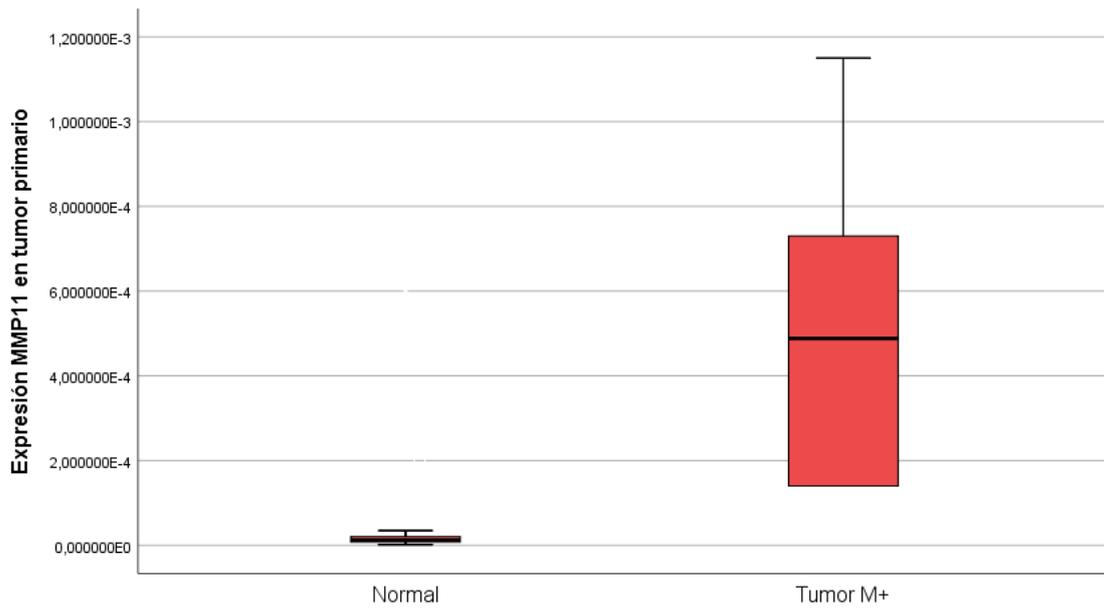


Figura 26. Aumento de expresión de MMP-11 en el tumor metastásico frente al normal (p=0,000)

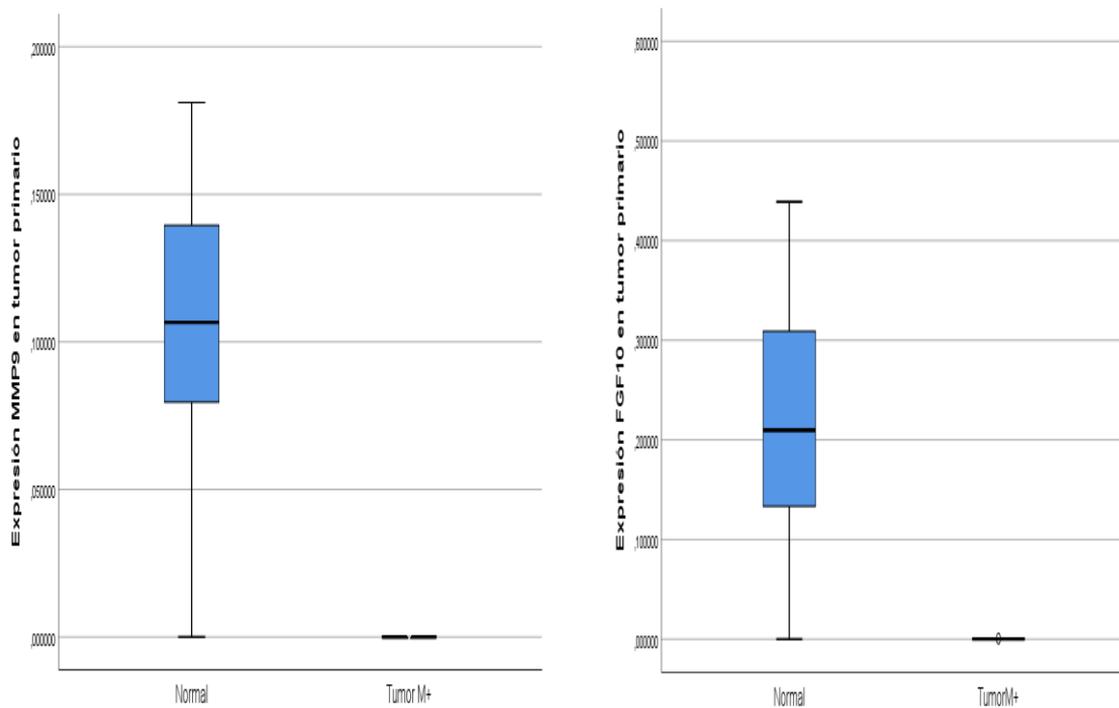


Figura 27. Disminución de expresión en tumores metastásicos de MMP-9 y de FGF-10 (p=0,000)

### **5.3 ANÁLISIS DE TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD EN LOS TUMORES LOCALIZADOS**

Para conocer la influencia de los marcadores estudiados en los cultivos de fibroblastos en la evolución de los tumores localizados, se analizó el tiempo libre de enfermedad después de la prostatectomía, basado en el tiempo hasta la recidiva bioquímica (PSA > 0,2 ng/ml). Todos los pacientes que mostraron la recidiva bioquímica fueron tratados con radioterapia pélvica.

La mediana de seguimiento de los tumores tratados mediante prostatectomía radical es de 70 meses (17-113). En 6 casos se ha detectado recidiva bioquímica con una mediana de 28 meses (10-60), siendo sometidos todos ellos a radioterapia sobre el lecho y en ganglios pélvicos. Actualmente no se ha detectado una recidiva bioquímica tras la irradiación, con una mediana de seguimiento total de 67 meses (17-76) en estos 6 casos.

El análisis de supervivencia (tiempo hasta la recidiva bioquímica) se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, comparando de forma univariable las curvas de supervivencia y evaluando así el efecto de cada uno de los factores moleculares sobre el tiempo hasta la recidiva. Para ello, se dividió la serie tomando como punto de referencia la mediana de la expresión de cada factor, de manera que se denominó expresión alta, aquellas que estaban por encima de la mediana y expresión baja las que estaban por debajo de la misma. Por último, se analizaron las variables que fueron significativas mediante el análisis de regresión de Cox, con la intención de determinar el efecto conjunto de los factores pronósticos que resultan significativos de forma independiente y cuantificar los riesgos relativos. Para realizar el estudio multivariable se analizaron los datos clínicos que han mostrado su influencia pronóstica de afectación extraprostática (grupos de riesgo d'Amico), es decir PSA ( $\leq 10$  vs  $> 10$  ng/ml), estadio clínico cT (T1 vs T2-3), y suma de Gleason de la biopsia-ISUP (ISUP  $\leq 3$  vs. ISUP  $> 3$ ), junto con los factores estromales que resultaron del estudio univariable. Además, se realizó el estudio multivariable teniendo en cuenta los datos patológicos (estadio, grado y márgenes en la pieza de prostatectomía), junto a los marcadores estromales que resultaron significativos en el estudio univariable.

### ➤ RESULTADOS ESTUDIO UNIVARIABLE

Únicamente se demostró un menor tiempo libre hasta la recidiva bioquímica significativo para **FGF-10**, de manera que se demostró que una mayor expresión de **FGF-10** en los fibroblastos se asociaba estadísticamente con menor tiempo libre de enfermedad ( $p= 0,042$ ) (Figura 28).

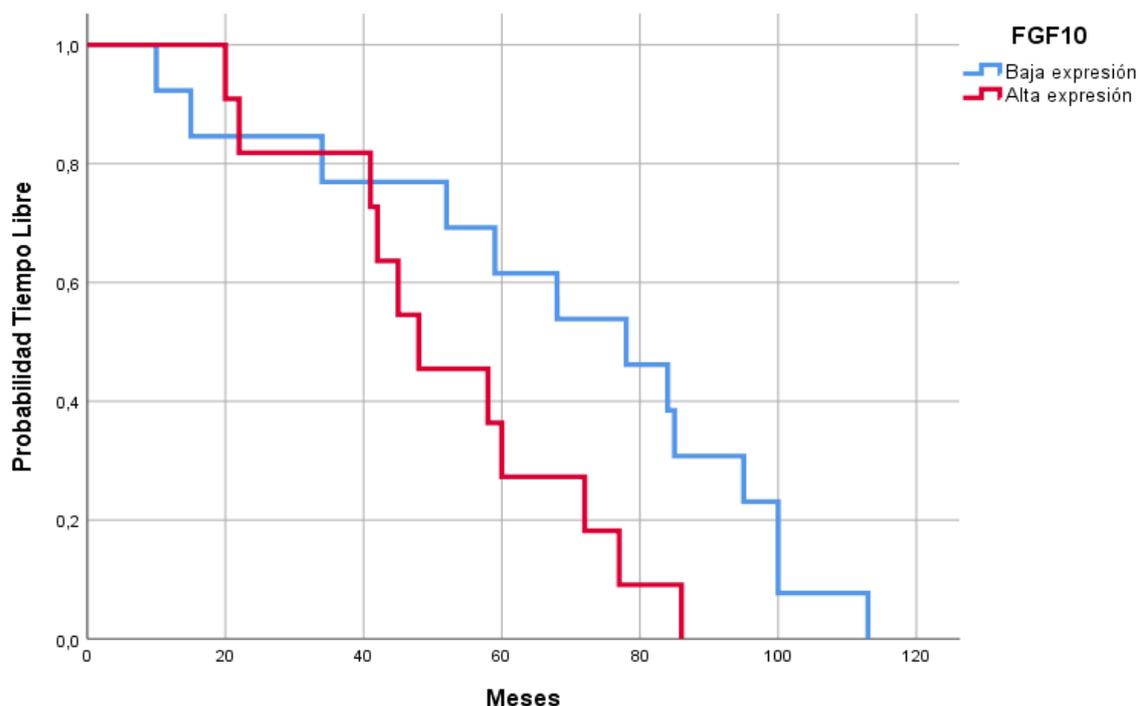


Figura 28. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Expresión alta de FGF-10 menor tiempo hasta la recidiva bioquímica ( $p= 0,042$ )

### ➤ RESULTADOS ESTUDIO MULTIVARIABLE

En el análisis de regresión de Cox incluyendo **FGF-10** y los parámetros clínicos de la biopsia de próstata como fueron el PSA, estadio y el grado de la biopsia, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos.

Del mismo modo **FGF-10** tampoco resultó un factor clínico predictor de recidiva al incluir datos de la prostatectomía radical como fueron el grado y estadio de la pieza y la presencia de márgenes afectos.

## 6. Discusión

---



Actualmente, el manejo preciso del cáncer de próstata recién diagnosticado sigue siendo un reto por conseguir. La incapacidad de los parámetros clínicos-patológicos (niveles de PSA, estadio TNM y puntuación de Gleason) para distinguir con precisión los pocos cánceres agresivos de los muchos cánceres indolentes continúa siendo el centro del problema del sobretratamiento que implica la prostatectomía radical y la radioterapia en tumores con poco potencial maligno. Así mismo, el tratamiento de la enfermedad con una puntuación de Gleason de 7 sigue siendo un desafío, lo que hace imprescindible identificar los cambios moleculares que resultan de la enfermedad y que sirvan como biomarcadores para predecir con mayor precisión la agresividad y el resultado a largo plazo de la enfermedad (285). Desde hace varios años, el PSA sérico se ha utilizado con esa finalidad; sin embargo, debido a sus limitaciones inherentes, incluida la falta de especificidad, el cribado del PSA ha demostrado ser controvertido (cuatro de cada cinco ensayos clínicos aleatorizados recientes mostraron poca o ninguna mejoría en la mortalidad asociada con el tratamiento agresivo de enfermedades inherentemente benignas) (286), lo que ha llevado a una búsqueda intensiva de biomarcadores alternativos del cáncer de próstata con un mejor potencial diagnóstico y predictivo. En particular, existe una búsqueda de biomarcadores que puedan distinguir entre tumores agresivos e indolentes, lo que conduce a mejores decisiones de tratamiento.

Hasta la fecha, el desarrollo de marcadores fiables se ha visto obstaculizado por la significativa heterogeneidad intratumoral de la enfermedad en cada paciente. Con el descubrimiento de tecnologías genómicas y proteómicas avanzadas, en los últimos años hemos experimentado una mejor comprensión de la biología del cáncer de próstata y como resultado se han descubierto varios biomarcadores prometedores. A esto se une el conocimiento de que el microambiente estromal influye de una manera definitiva en el desarrollo del cáncer prostático; sin embargo, los mecanismos por los cuales el estroma regula el crecimiento de las células epiteliales en el cáncer de próstata aún no son bien conocidos. Recientemente, el estudio del estroma tumoral está cobrando mayor importancia reconociendo el estroma como inductor del crecimiento y diferenciación del epitelio glandular prostático asociado a andrógenos, existiendo un mecanismo recíproco que juega un papel central en la carcinogénesis y progresión del cáncer de próstata. Durante la progresión del cáncer, las células tumorales alteran las propiedades del estroma circundante para crear un microambiente de apoyo. A su vez, las células del estroma modificadas se vuelven más activas y promueven la progresión del cáncer. Se cree que los diferentes tipos de factores de crecimiento y citocinas secretadas por las células

estromales reactivas y las interacciones directas entre el estroma y el epitelio desempeñan un papel clave en la progresión del cáncer. Así, el conocimiento y estudio de los denominados fibroblastos asociados al carcinoma (CAF) están siendo fuente de investigación por tratarse de las células más importantes en el estroma activado del CaP.

La actividad de nuestro grupo se ha centrado en la investigación del comportamiento clínico de los carcinomas humanos de diverso origen. En este trabajo profundizamos en la importancia del estroma tumoral en el CaP y evaluamos la expresión genómica de diferentes factores derivados del estroma prostático, centrando la actividad en la investigación del comportamiento clínico del CaP e intentando trasladar de la investigación básica a la práctica clínica el interés de diferentes parámetros de la biología molecular del CaP. Nuestra actividad se centra en el análisis del impacto clínico de la expresión de diversas proteínas de interés en la biología molecular del CaP.

Así, en nuestro estudio evaluamos la expresión de diferentes factores derivados de los fibroblastos del estroma prostático en pacientes con cáncer de próstata localizado y metastásico, centrando nuestro objetivo en el análisis del impacto clínico que la expresión de dichas proteínas pueda tener en el comportamiento del CaP.

La mayoría de las investigaciones se han basado en el estudio del epitelio maligno prostático, si bien nuestra investigación se centra en el estroma prostático, dado el conocimiento reciente del estroma tumoral, que juega un papel importante en la invasión y en la progresión del cáncer, resultando su genoma más estable que el del epitelio tumoral, y constituye fuente de nuevos biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas. Además, son pocos los estudios existentes sobre el estroma prostático utilizando cultivos celulares de fibroblastos de próstatas humanas y su relación con el epitelio. El logro de los objetivos propuestos permite conocer mejor las características del estroma prostático y las potenciales diferencias entre el tumoral y el no tumoral. Así, es posible que podamos establecer marcadores de diagnóstico antes de que aparezca el propio adenocarcinoma o de pronóstico que determinen la evolución de la neoplasia, planteando las primeras bases para identificar moléculas candidatas a representar nuevas dianas terapéuticas en el CaP. La investigación que hemos realizado ha mostrado un papel relevante del estroma en su desarrollo o progresión.

Nuestro trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a la existencia de un equipo multidisciplinar con experiencia en trabajos de traslación clínica en CaP que ya han sido presentados en publicaciones internacionales en revistas de impacto. Destaca en el año 2017, los resultados publicados de diferentes factores estromales involucrados en el

desarrollo, progresión y resistencia a la castración de CaP en muestras procedentes de tejido prostático recogidas por nuestro equipo (101).

En nuestro trabajo analizamos la expresión e influencia del RA, así como la expresión de diferentes factores de crecimiento, entre los que se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-2, FGF-7 y FGF-10), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor derivado de plaquetas B (PDGF-B), así como varias metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9 y MMP-11).

Nuestros marcadores se evaluaron en los fibroblastos cultivados procedentes de tumores de próstata localizados, así como en los carcinomas metastásicos, tomando además muestras de tejido periférico al tumor (en pacientes con neoplasias localizadas) que se han considerado como tejido control normal, al no demostrarse en el estudio histopatológico de la biopsia la presencia de adenocarcinoma prostático en las zonas correspondientes.

La finalidad de este trabajo ha sido el estudio del comportamiento de estos marcadores estromales y su relación con las características clínico-patológicas tumorales. A continuación, discutiremos nuestros resultados comparándolos con la literatura existente, en aquellos marcadores cuya expresión pudiera tener cierta relevancia en la práctica clínica.

## **6.1 Correlación entre la expresión de los factores a estudio y el PSA**

En cuanto a la asociación entre la expresión de los factores por parte de los fibroblastos peritumorales en relación con las características clínico-patológicas en tumores localizados, no se demostró en nuestro trabajo una correlación estadística entre el nivel de PSA y la expresión de ninguno de los marcadores de estudio.

Algunos autores han descrito que la expresión del factor TGF $\beta$ -1 presenta una correlación negativa con el PSA, disminuyendo en tumores avanzados y asociándose con un menor riesgo de CaP agresivo demostrando un efecto protector frente al CaP de alto grado y de mal pronóstico (214). Las cifras de PSA se encuentran habitualmente más elevadas en los tumores avanzados que en estadios más precoces, de donde se explicaría una correlación negativa entre los niveles de PSA y la expresión TGF $\beta$  no encontrados en nuestro estudio, al cual habría que añadir más casos en posteriores trabajos para así poder buscar esta posible relación.

Otros estudios encuentran que la elevación significativa de HGF sugiere un mayor riesgo de CaP, y observan como los pacientes con CaP tenían concentraciones más altas de PSA y HGF (221), señalando como el HGF en combinación con el volumen prostático puede detectar el CaP en pacientes con niveles de PSA de la zona gris inferiores a 10 ng/ml (217).

En el CaP, algunos trabajos describieron el uso del factor PDGF-B como biomarcador en orina, y encuentran como los pacientes con CaP tenían mayores niveles de PSA y de PDGF-B (246).

Hallazgos recientes han mostrado una mayor expresión de MMP-11 en el CaP cuando el PSA fue más alto (101).

Nuestro estudio no encontró asociación entre la expresión de ninguno de los marcadores y el PSA. La sobreexpresión del receptor androgénico epitelial maligno junto a la pérdida de reactividad del mismo en el estroma periférico se ha asociado con alto grado y PSA en el CaP (83). Varios estudios han informado que las interacciones sensibles e insensibles a los andrógenos entre las células estromales y epiteliales determinan cómo las células epiteliales de la próstata responden a la ablación de andrógenos (287). En un entorno con bajo contenido de andrógenos, las interacciones estroma-epitelial pueden ser un mecanismo importante que controla la actividad del RA y la expresión de PSA regulada por el RA (288). Así, se podría señalar que la maquinaria molecular del estroma implicada en la carcinogénesis del CaP, en la que intervienen estos factores parece no depender directamente de andrógenos, lo cual es muy importante a la hora de buscar nuevas vías de desarrollo tumoral diferentes a las convencionales y que pudieran explicar en fases avanzadas la progresión tumoral y la conversión en CPRC.

## **6.2 Correlación entre los factores estromales y las características clínico-patológicas en tumores localizados**

Al estudiar la relación de la expresión génica de los factores con el estadio tumoral en tumores localizados, encontramos que a mayor estadio tumoral se demostró una mayor expresión de MMP-11 y una disminución de la expresión de TGF $\beta$ -1.

Las MMPs al adherirse a factores proapoptóticos, dan lugar a un fenotipo más agresivo a través de la generación de células resistentes a la apoptosis (253). La MMP-11 se expresa sobre todo por las células peritumorales y se asocia a progresión tumoral y mal pronóstico (270). La MMP-11 se encuentra en grandes porcentajes en el estroma de

CaP (283) en diversos trabajos, que encuentran como sus niveles se correlacionan positivamente con el estadio tumoral (284), en consonancia con nuestros resultados alcanzados.

En cuanto a TGF $\beta$ -1 encontramos una disminución TGF $\beta$ -1 al aumentar el estadio tumoral. Este factor es capaz de promover la angiogénesis y la transición de células epiteliales a células mesenquimales, lo que significa que participa en el proceso de invasión tumoral (204). Estudios en el cáncer de mama han demostrado que la expresión de TGF $\beta$ -1 es mayor en el estroma en tumores de mama de alto estadio (203). Investigaciones en el CaP identifican el TGF $\beta$ -1 como un predictor de la progresión del CaP y el desarrollo de metástasis (192). En la progresión del CaP señalan la expresión alterada de TGF $\beta$ -1 en las muestras de CaP con respecto a tejido prostático normal, jugando un papel en el desarrollo del tumor (213). Diversas investigaciones observan un aumento de expresión de TGF $\beta$ -1 que se asocia con la presencia de tumores más agresivos y mal pronóstico, dado que se hacen resistentes a su inhibición de la proliferación celular (215). En otros trabajos, sin embargo, observan como TGF $\beta$ -1 se asocia con un menor riesgo de CaP agresivo demostrando un efecto protector frente al CaP de alto grado y de mal pronóstico (214). Algunos autores observan una alteración en la expresión de TGF $\beta$ -1 en las muestras de CaP con respecto a tejido sano (213). Defienden que TGF $\beta$ -1 juega un papel en el desarrollo del tumor que debe ser investigado. Otros estudios concluyen que algún genotipo de TGF $\beta$ -1 parece tener un efecto protector frente a tumores de alto grado y de mal pronóstico (214). Esto refuerza nuestro resultado de encontrarse, al parecer, disminuida su expresión en este tipo de tumores, que son precisamente los de peor pronóstico.

Encontramos también que una suma de Gleason más alta en la pieza de prostatectomía radical se asoció significativamente con una disminución de las expresiones de MMP-2 y de TGF $\beta$ -1 en los tumores localizados.

Diferentes estudios en el CaP evalúan la expresión de MMP-2 en el CaP, y asocian el aumento de la MMP-2 con un grado Gleason tumoral alto, un estadio patológico avanzado, y la recurrencia de la enfermedad (258). Otros estudios encuentran una menor expresión de MMP-2 por fibroblastos en el CaP en comparación con los fibroblastos de la HBP (101). Nuestros resultados hallan expresión de la MMP-2 en tumores localizados de CaP asociando un mayor grado de Gleason con una disminución de la expresión de la MMP-2.

En cuanto a la expresión de TGF $\beta$ -1 en la progresión del CaP, diversas investigaciones estudian la asociación de los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 antes y después de la prostatectomía radical, y encuentran que los niveles plasmáticos preoperatorios de este factor están asociados con la progresión y metástasis a distancia del CaP pero no con el grado histológico de la enfermedad ni con el volumen de tumor local. Observan como los niveles pre y posoperatorios de TGF- $\beta$ 1 se elevan significativamente en pacientes con extensión extraprostática, invasión de vesículas seminales y metástasis a los ganglios linfáticos (212). Estos estudios no encuentran asociación de la mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 en relación a un mayor grado histológico, resultados que estarían en armonía con nuestro hallazgo, en donde incluso hallamos que a mayor grado histológico menor expresión del factor.

### **6.3 Correlación entre la expresión de los diferentes factores estromales en tumores localizados**

Estudiamos la asociación entre los propios marcadores en los tumores localizados. Encontramos correlaciones estadísticas entre RA con las de FGF-7, FGF-10 y HGF, de manera que al aumentar la expresión del receptor androgénico también lo hizo la de los otros factores. Relación significativa entre FGF-7 con FGF-10 y HGF, de forma que al aumentar la expresión de FGF-7 también lo hizo la de los otros dos factores. El factor HGF con la MMP-2, al aumentar la MMP-2 también aumentó el HGF. Correlación también significativa entre MMP-9 y el factor TGF $\beta$ -1, al incrementarse la de MMP-9 aumentaba significativamente la de TGF $\beta$ -1.

Algunos trabajos muestran la asociación entre RA y factores de crecimiento. Se ha demostrado que el TGF $\beta$  participa aumentando la actividad del RA (106). Existen varios factores que tienen la capacidad de estimular la expresión del FGF-7 en las células estromales. Varios estudios demuestran que citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) y especialmente la interleucina-1 (IL-1) aumentan la transcripción y la síntesis proteica de FGF-7 en fibroblastos (168). Investigaciones recientes muestran una mayor expresión de RA y el FGF-7 en los carcinomas prostáticos (76). El aumento de los niveles de RA en las células del estroma promueve la expresión de FGF10, que luego actúa de manera paracrina para elevar los niveles de RA en las células epiteliales de la próstata y potencialmente también de manera autocrina para elevar aún más los niveles de RA en el estroma (179). Al igual que el FGF-

2, FGF-7. FGF-10, el factor de crecimiento HGF también se ve afectado significativamente por andrógenos y antiandrógenos en células estromales cultivadas in vitro (184). De este modo, los andrógenos que actúan a través del estroma pueden provocar un aumento de la expresión de factores de crecimiento estimulando la progresión de CaP y la transformación maligna (184).

En el CaP se observan cambios fenotípicos en el estroma que se asocian al cáncer que incluyen una expresión alterada de los factores de crecimiento como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), y FGF-2, FGF-7 y FGF-10, y otros factores de crecimiento como HGF (184). El PDGF-B estimula la liberación de TGF $\beta$  y promueve la diferenciación miofibroblástica. Además, induce la secreción de HGF y de FGF-2 (233). TGF $\beta$  regula la producción de ARNm del FGF-2 en las líneas celulares PC3 haciéndolas resistentes a la apoptosis (210). FGF-10 y FGF-7 se expresan, en estudios con ratas, en tumores de próstata bien diferenciados (181).

Estudios sobre las proteínas implicadas en la invasión, encuentran en las metástasis óseas, como el TGF $\beta$ -1 puede ser activado por MMP-9 y MMP-2 promoviendo el crecimiento tumoral (191).

#### **6.4 Comparación de la expresión de los marcadores en tumores localizados con la de los tumores metastásicos**

En nuestro trabajo observamos el incremento de la expresión de FGF-7, MMP-2 y MMP-11 en tumores localizados respecto al tejido prostático no tumoral. Por el contrario, aparece una disminución de FGF-10 y MMP-9 en los fibroblastos de cáncer de próstata localizado (CPL) respecto al tejido normal.

El factor FGF-7 se cree que es uno de los factores de crecimiento más importantes en el control de la homeostasis de la próstata junto con los andrógenos (167). La expresión de FGF7 es estimulada por andrógenos en las células del estroma prostático, pero no en las células epiteliales. Cuando existe una activación aberrante de las vías de los FGF, aparece una progresión de CaP (167). Algunos autores afirman no encontrar una mayor expresión de FGF-7 en cánceres de próstata clínicamente localizados que contrasta con otros informes que hablan de un aumento de FGF-7 en células de cáncer de próstata. En nuestros resultados, al igual que en otros trabajos, observamos como en el cáncer de próstata localizado (CPL) el FGF7 se encuentra altamente expresado en los CAF (101),

y al igual que nuestros resultados no aparecieron asociaciones entre la expresión de FGF-7 con el grado y el estadio tumoral (175).

Por el contrario, aparece una disminución de la expresión de FGF-10 respecto al tejido prostático no tumoral. El FGF-10 es un factor significativo durante la transición epitelial-mesenquimal (EMT) esencial en el cáncer y en la metástasis (177). Algunos autores estudian el papel de FGF-10 en CaP en ratas, y observan niveles elevados de la expresión de FGF10 en la próstata de la rata, tumores de próstata de rata bien diferenciados con un compartimento epitelial y estromal y en células del estroma prostático derivadas en cultivo (181), teniendo una expresión específica en las células del estroma de origen muscular liso (92). Esto puede explicar por qué en nuestro estudio FGF10 disminuye en los tumores localizados, puesto que en el estroma de CaP, las células musculares lisas se sustituyen por CAF. Diversos estudios han demostrado el papel de FGF10 en la carcinogénesis de la próstata en sinergia con la sobreexpresión de FGFR1/2 y la sobreexpresión del protooncogen Src en células de ratones, induciendo tumores epiteliales de alto grado (182), sin embargo, hay otros trabajos en los que parece que estas afirmaciones no están tan claras en el caso de la próstata humana (182). La expresión de FGF-10 se estimula por la acción de los andrógenos y puede ejercer un efecto mitogénico sobre el epitelio prostático (92). Algunos autores señalan que la sobreexpresión de FGF-10 en los fibroblastos de la próstata induce experimentalmente la formación de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) multifocal en el epitelio adyacente (183). Su aumento de expresión promueve la formación de CaP bien diferenciado (177). El PIN o adenocarcinoma inducido por FGF10 podría persistir en un microambiente bajo en FGF10, como resultado de cambios epiteliales sostenidos que evaden la dependencia crónica de este factor de crecimiento y la activación sostenida del RA. Así, según progresa el tumor, la expresión de FGF10 disminuye (183). En nuestro trabajo se evidencia una disminución de la expresión de FGF10 en los fibroblastos de los tumores localizados y de los tumores metastásicos como se mostrará más adelante. Este descenso podría servir como potencial marcador de tumor avanzado, siendo precisas investigaciones que aclaren el papel de FGF10 como andromedina en CaP.

En cuanto a los factores implicados en la invasión, las MMPs al adherirse a factores proapoptóticos dan lugar a un fenotipo más agresivo a través de la generación de células resistentes a la apoptosis (253).

La expresión de MMP-2 tiene un papel relevante en la progresión del cáncer por su acción degradante sobre la membrana basal (250). La MMP-2 se asocia con tumores avanzados y se relaciona con la recurrencia del tumor, alcanzando casi la significación estadística (258). En nuestro estudio observamos que en las muestras de CaP aparece aumentada la expresión de MMP-2 respecto al tejido normal. Se ha encontrado que la expresión de MMP-2 se encuentra elevada en cualquier alteración del tejido prostático, desde HBP a la presencia de tumores localizados o metastásicos o incluso la deprivación androgénica, apoyando otras investigaciones la mayor expresión en CaP (263). Parece que la expresión de MMP-2 se asocia significativamente con el grado de malignidad del CaP, destacando su papel en el crecimiento tumoral y la metástasis viendo su potencial para poder usar a la MMP-2 como marcador molecular del CaP (263).

En tumores localizados, encontramos también un aumento de la expresión de MMP-11 respecto al tejido normal. En el cáncer de mama, la MMP-11 se expresa en células estromales peritumorales, y está asociada con la progresión del tumor y metástasis (252). Los estudios de Vizoso et al demostraron que la MMP-11 se expresa preferentemente en las células del estroma peritumoral y que los altos niveles de MMP-11 se asociaron con la progresión tumoral y mal pronóstico (251). En la próstata diversas investigaciones señalan porcentajes más altos de expresiones de MMP-11 por las células de fibroblastos de los carcinomas de próstata en comparación con los fibroblastos de la HBP (283). En el CaP sus niveles se correlacionan positivamente con la suma de Gleason del tumor, el estadio y la presencia de metástasis (284). Estudios recientes demuestran una relación de la expresión de MMP-11 con la presencia de tumores prostáticos agresivos (284). Hallazgos recientes han identificado la expresión de MMP-11 era significativamente alta en los fibroblastos asociados al cáncer de carcinomas de próstata resistentes a la castración y fibroblastos de tumores metastásicos demostrándose una alta expresión de MMP-11 (101). En los tumores avanzados, en fases de mayor agresividad tumoral o resistencia a la castración, la producción de MMP -11 por los fibroblastos resultó significativamente mayor que en los tumores no metastásicos o en fases de sensibilidad a la castración (98). Resultados que están en armonía con los nuestros, donde el CaP localizado presenta mayor expresión de MMP-11, aumentando más su expresión a mayor estadio tumoral y, donde encontramos mayor expresión, como indicaremos posteriormente en los tumores metastásicos respecto al tejido normal.

En cuanto a la MMP-9, su expresión aparece disminuida respecto al tejido normal. Se ha descrito en el cáncer de mama una producción de MMP-2 que aumenta durante las primeras fases, mientras que la activación de MMP-9 se produce en etapas posteriores en la progresión de la enfermedad (82). En pacientes con enfermedad prostática, investigaciones encuentran expresiones significativas más altas de la MMP-9 en tejidos en CaP que en tejidos de hiperplasia benigna de próstata; sin embargo, otros estudios encuentran que la actividad de MMP-9 aumenta en la orina de pacientes con hiperplasia benigna de próstata en comparación con pacientes con CaP (272). Se ha encontrado una expresión aumentada de MMP-9 en el CaP, correlacionándolo con mayor Gleason y fenotipos invasivos (275), resultados que no hemos podido corroborar en nuestro trabajo. Parece que tanto la sobreexpresión del RA como la estimulación con DHT producen un aumento de MMP-9 (277), sin embargo, si combinamos ambos fenómenos, este aumento no tiene lugar, lo que sugiere que el RA es capaz de inducir la expresión de MMP-9 en las células con CaP de manera independiente de los andrógenos. Esto coincide con nuestros resultados dado que, al bloquear el RA, disminuye la expresión de MMP-9 con respecto a la de los fibroblastos de los tumores localizados.

Estudiamos también la expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata metastásico (CPM+). Hay que decir que en el grupo de CPM+ no analizamos como en el grupo de CPL los aspectos referentes a la asociación con los parámetros clínicos, dado el limitado número de pacientes en este grupo.

En pacientes con tumores metastásicos, se encontraron aumentadas las mismas expresiones que en los tumores localizados, es decir las de FGF-7, MMP-2 y MMP-11, disminuyendo igualmente su expresión respecto al tejido normal la de FGF-10 y MMP-9. No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos, lo cual implica, por un lado, que son capaces de diferenciar la presencia de una neoplasia respecto al tejido normal, pero no si el tumor está confinado en la glándula o es metastásico. El hecho de que en nuestros resultados aparezca un patrón de factores que aumentan o disminuyen en el CaP, tanto en el CPL como en el CPM+, como los marcadores FGF-7, MMP-2 y MMP-11 que aumentan, y FGF-10, MMP-9 que disminuyen, favorece la teoría de que en el estroma de la próstata se producen una serie de cambios, que podríamos decir que son compartidos respecto al tejido normal de la próstata, viendo claro como los fibroblastos del estroma tumoral reactivo difieren de los fibroblastos del tejido normal, siendo importante en ello la influencia probablemente por otros factores del estroma.

## **6.5 Relación entre la expresión estromal y el tiempo libre de enfermedad en el cáncer de próstata localizado**

Una parte importante del estudio es que realizamos un análisis de tiempo libre de enfermedad en tumores localizados. Se demostró diferencias significativas en el tiempo hasta la recidiva bioquímica tras prostatectomía radical para el factor FGF-10.

Algunos trabajos han estudiado los marcadores en el CaP, y su asociación con la recurrencia bioquímica. Así, la expresión de FGF-2 del estroma se asocia a una mayor tasa de recurrencia bioquímica (166). Investigaciones actuales observan la expresión de HGF por los tejidos de CaP y relacionan una mayor concentración de HGF con un mayor riesgo de recurrencia del cáncer, mostrando como expresión aumentada de HGF en suero se asociaba con una menor supervivencia libre de progresión (221). Estos estudios han demostrado que una alta expresión de PDGFR $\beta$  en el estroma del CaP se asocia de forma significativa con la recurrencia bioquímica y clínica en pacientes con CaP tratados mediante prostatectomía radical, y encuentran que la expresión media de PDGFR $\beta$  es mayor en el estroma tumoral que en el estroma normal (241). Diversos autores señalan que la expresión aumentada de MMP-2 se correlaciona negativamente con la supervivencia libre de enfermedad en CaP (264), y encuentran que la expresión de MMP-2 por las células similares a fibroblastos se asoció inversamente con la recurrencia bioquímica (265). Hallazgos sobre la MMP-9 nos indican también que la expresión de MMP-9 se correlacionó positivamente con una supervivencia libre de enfermedad más corta (275), y la expresión aumentada de MMP-11 con un aumento de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical, y en el CaP avanzado con una disminución en la supervivencia específica para el cáncer (284).

En nuestro trabajo se demostró en el análisis de supervivencia, analizando el tiempo hasta la recidiva bioquímica, que a mayor expresión de FGF-10 en los fibroblastos se asociaba estadísticamente con menor tiempo libre de enfermedad, resultando en el estudio univariable ser un factor clínico predictor de recidiva bioquímica, pero no se encontraron factores clínicos ni patológicos independientes de recidiva bioquímica en el estudio multivariable.

Con todo lo anteriormente descrito, el principal logro de los objetivos propuestos permitirá conocer mejor las características del estroma prostático y las potenciales diferencias entre el tejido tumoral y el no tumoral.

A pesar de que en la carcinogénesis y en la progresión del tumor prostático influye el estroma, no existen muchos trabajos que centren su atención en las alteraciones moleculares del mismo. La complejidad de su estudio lo hemos paliado con la utilización de cultivos de los fibroblastos activados peritumorales. En base a una mayor estabilidad genética que la del epitelio tumoral, hemos establecido la existencia de marcadores de diagnóstico antes de que aparezca el propio adenocarcinoma o de pronóstico que determinen la evolución de la neoplasia. Se plantean así, las primeras bases para la identificación de moléculas candidatas a representar nuevas dianas terapéuticas en el CaP. Los resultados del estudio pueden contribuir a responder a algunos interrogantes sobre el conocimiento acerca del papel del estroma tumoral en el compartimento evolutivo del carcinoma prostático. Esperamos que la terapia dirigida al compartimento estromal sea clínicamente prometedora, y un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a las interacciones entre el tumor y el estroma pueda producir nuevas dianas terapéuticas para el cáncer de próstata.

En definitiva, se requieren más estudios para comprender las complejas interacciones entre las células cancerosas y el microambiente tumoral, siendo el papel de los factores estromales cada vez más destacado en las estrategias futuras para abordar la enfermedad.

## **6.6 Limitaciones**

La principal limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño muestral. El número de casos es limitado dada la complejidad de la metodología para el procesado del tejido obtenido durante el cultivo celular, con la pérdida de muestras por la contaminación de las mismas en los cultivos. De todos modos, consideramos que el número de casos es suficiente para obtener datos fiables que demuestren los objetivos establecidos, pretendiendo ser nuestro trabajo un paso en la búsqueda de marcadores que abra la posibilidad de nuevas investigaciones sobre el estroma tumoral.

Por otro lado, existe una gran dificultad para obtener tejido tumoral prostático de la pieza de PR para cultivo, por ello realizamos biopsias de próstata transrectales sistemáticas. Para asegurar la obtención de muestra, se recogieron muestras pareadas durante la biopsia previa, existiendo la posibilidad de que en el cilindro de estudio no se encontrara un carcinoma y sí en la muestra usada para diagnóstico. No obstante, se intentaron obtener muestras muy cercanas para que resultaran similares a las que se utilizaron para el diagnóstico, teniendo en cuenta que se trata de un estudio del estroma

peritumoral, y no propiamente de las células tumorales. Esta dificultad, junto con la contaminación durante la obtención del material pueden minimizarse mediante las biopsias transperineales dirigidas mediante fusión de imágenes de Resonancia Magnética con ecografía a tiempo real que permitirían disminuir este error además del número de muestras que se contaminan durante la obtención y el procesado, puesto que la vía perineal es mucho menos contaminada. Además, al ser biopsias dirigidas a imágenes sospechosas, se puede tomar de manera mucho más precisa tejido procedente de los focos tumorales y, en zonas alejadas, tejido normal de control. Esto abre nuevas posibilidades para continuar la línea de investigación iniciada, pues permitirá afinar el muestreo de las piezas a estudiar en próximas investigaciones.

Para realizar los análisis estadísticos de este trabajo, hemos empleado la suma de Gleason y la clasificación ISUP. Aunque en los pacientes con tumores localizados se utilizó la suma de Gleason de la pieza de PR, en los pocos casos de tumores metastásicos empleamos la suma de Gleason de la biopsia prostática pudiendo no haber concordancia con la del tumor, por lo que serían resultados menos precisos.

Por último, dada la naturaleza del estudio y su duración, no es posible obtener un seguimiento representativo de la evolución de este tumor tras PR.

## **7. Conclusiones**

---



**1- En cuanto a la expresión del receptor androgénico, de los factores de crecimiento y de las MMPs de los fibroblastos peritumorales en relación con las características clínico-patológicas en tumores localizados:**

- No se demostró una correlación estadística entre el nivel de PSA y la expresión de ninguno de los marcadores de estudio.
- A mayor estadio tumoral se demostró una mayor expresión de MMP-11 y una disminución de la expresión de TGF $\beta$ -1.
- Una suma de Gleason más alta en la pieza de prostatectomía radical se asoció significativamente con una disminución de las expresiones de MMP-2 y de TGF $\beta$ -1.

**2- Sobre las Correlaciones entre la expresión de marcadores estromales en tumores localizados, resultaron significativas las correlaciones de las expresiones de los siguientes factores:**

- Receptor androgénico con las de FGF-7, FGF-10 y HGF, de manera que al aumentar la expresión del receptor androgénico también lo hizo la de los otros factores.
- Se demostró que un incremento de FGF-7 se correlacionó significativamente con el de FGF-10 y HGF, de forma que al aumentar la expresión de FGF-7 también lo hizo la de los otros dos factores.
- Metaloproteinasas. Al aumentar la expresión de MMP-2 también lo hizo la de HGF y al incrementarse la de MMP-9 aumentaba significativamente la de TGF $\beta$ -1.

**3- Al comparar la expresión en tumores localizados con la de los metastásicos y ambos con la del tejido no tumoral:**

- En pacientes con tumores localizados, se observaron aumentadas las expresiones de FGF-7, MMP-2 y MMP-11, respecto al tejido prostático no tumoral. Por el contrario, disminuyeron su expresión respecto al tejido normal FGF-10 y MMP-9.
- En pacientes con tumores metastásicos, se encontraron aumentadas las mismas expresiones que en los tumores localizados, es decir las de FGF-7, MMP-2 y MMP-11, disminuyendo igualmente su expresión respecto al tejido normal la de FGF-10 y MMP-9.
- No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos.

**4- En el análisis de supervivencia, FGF-10 estromal resultó en el estudio univariable ser un factor clínico predictor de recidiva bioquímica, pero no se encontraron factores clínicos ni patológicos independientes de recidiva bioquímica en el estudio multivariable.**

## **8. Bibliografía**

---



1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
2. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Dec 15;127(12):2893–917. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25516>
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):765–81.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. G 2008. GLOBOCAN 2008: Incidencia y mortalidad por cáncer en todo el mundo - IARC [Internet]. Available from: <https://www.iarc.fr/news-events/globocan-2008-cancer-incidence-and-mortality-worldwide/>
5. Wong MCS, Goggins WB, Wang HHX, Fung FDH, Leung C, Wong SYS, et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur Urol*. 2016;70(5):862–74.
6. Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A. Situación epidemiológica del cáncer de próstata en España. *Actas Urol Esp*. 2006;30(6):574–82.
7. Jaume Galceran, Alberto Ameijide, Marià Carulla, Antonio Mateos, José Ramón Quirós, Araceli Alemán, Dolores Rojas, Ana Torrella, Matilde Chico, Marisa Vicente, José María Díaz, Nerea Larrañaga(\*), Rafael Marcos-Gragera, María José Sánchez, Josefina Peruch RPB. ESTIMACIONES DE LA INCIDENCIA Y LA SUPERVIVENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA Y SU SITUACIÓN EN EUROPA - PDF Descargar libre [Internet]. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2014. Available from: <https://docplayer.es/15977257-Estimaciones-de-la-incidencia-y-la-supervivencia-del-cancer-en-espana-y-su-situacion-en-europa.html>
8. Solís-Martínez R, Hernández-Flores G, Ochoa-Carrillo FJ, Ortiz-Lazareno P, Bravo-Cuellar A. Tumor-associated macrophages contribute to the progression of prostate cancer. Vol. 14, *Gaceta Mexicana de Oncología*. Masson-Doyma Mexico, S.A.; 2015. p. 97–102.
9. Broseta Rico E, Budía Alba A, Burgués Gasió JP, Marco SL. *Urología práctica*. Elsevier Health Sciences Spain; 2016. 826 p.
10. Schottenfeld D, Fraumeni JF. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Vol. 9780195149, *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press; 2009. 1–1410 p.
11. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. Vol. 4, *Clinical Epidemiology*. 2012. p. 1–11.
12. Breslow N, Chan CW, Dhom G, Drury RA, Franks LM, Gellei B, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer* [Internet]. 1977;20(5):680–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/924691>

13. Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol.* 2012 Oct;62(4):656–61.
14. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. Vol. 30, *World Journal of Urology.* 2012. p. 143–8.
15. Stewart RW, Lizama S, Peairs K, Sateia HF, Choi Y. Screening for prostate cancer. Vol. 44, *Seminars in Oncology.* W.B. Saunders; 2017. p. 47–56.
16. Eeles RA, Olama AA Al, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet.* 2013 Apr;45(4):385–91.
17. Al Olama AA, Dadaev T, Hazelett DJ, Li Q, Leongamornlert D, Saunders EJ, et al. Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans. *Hum Mol Genet.* 2015 Oct 1;24(19):5589–602.
18. Tan DSW, Mok TSK, Rebbeck TR. Cancer genomics: Diversity and disparity across ethnicity and geography. *J Clin Oncol.* 2016 Jan 1;34(1):91–101.
19. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2016 Aug 4;375(5):443–53.
20. Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, Evans DG, Bancroft E, Adlard J, et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1[Formula presented] and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *Eur Urol.* 2020 Jan 1;77(1):24–35.
21. Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C, et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. Vol. 138, *International Journal of Cancer.* Wiley-Liss Inc.; 2016. p. 2579–91.
22. Kramer BS, Hagerty KL, Justman S, Somerfield MR, Albertsen PC, Blot WJ, et al. Use of 5- $\alpha$ -reductase inhibitors for prostate cancer chemoprevention: American society of clinical oncology/American Urological Association 2008 clinical practice guideline. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 20;27(9):1502–16.
23. Haider A, Zitzmann M, Doros G, Isbarn H, Hammerer P, Yassin A. Incidence of Prostate Cancer in Hypogonadal Men Receiving Testosterone Therapy: Observations from 5-Year Median Followup of 3 Registries. *J Urol.* 2015 Jan 1;193(1):80–6.
24. Dickerman BA, Markt SC, Koskenvuo M, Pukkala E, Mucci LA, Kaprio J. Alcohol intake, drinking patterns, and prostate cancer risk and mortality: a 30-year prospective cohort study of Finnish twins. *Cancer Causes Control.* 2016 Sep 1;27(9):1049–58.
25. Key TJ. Nutrition, hormones and prostate cancer risk: Results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Recent Results Cancer Res.* 2014;202:39–46.
26. Lippi G, Mattiuzzi C. Fried food and prostate cancer risk: Systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr.* 2015 Aug 1;66(5):587–9.

27. Ilic D, Misso M. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: A systematic review. Vol. 72, *Maturitas*. 2012. p. 269–76.
28. Bylsma LC, Alexander DD. A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat, meat cooking methods, heme iron, heterocyclic amines and prostate cancer. Vol. 14, *Nutrition Journal*. BioMed Central Ltd.; 2015.
29. Zhang M, Wang K, Chen L, Yin B, Song Y. Is phytoestrogen intake associated with decreased risk of prostate cancer? A systematic review of epidemiological studies based on 17,546 cases. *Andrology*. 2016 Jul 1;4(4):745–56.
30. Applegate CC, Rowles JL, Ranard KM, Jeon S, Erdman JW. Soy consumption and the risk of prostate cancer: An updated systematic review and meta-analysis. Vol. 10, *Nutrients*. MDPI AG; 2018.
31. Kristal AR, Till C, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Neuhauser ML, et al. Plasma vitamin D and prostate cancer risk: Results from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(8):1494–504.
32. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2009 Jan 7;301(1):39–51.
33. James N'Dow B et al. Guidelines of the European Association of urology [Internet]. 2020 edition. Available from: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#3>
34. Vidal AC, Howard LE, Moreira DM, Castro-Santamaria R, Andriole GL, Freedland SJ. Obesity increases the risk for high-grade prostate cancer: Results from the REDUCE study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Dec 1;23(12):2936–42.
35. Preston MA, Riis AH, Ehrenstein V, Breau RH, Batista JL, Olumi AF, et al. Metformin use and prostate cancer risk. *Eur Urol*. 2014 Dec 1;66(6):1012–20.
36. Raslau D, Summerfield DT, Abu Dabrh AM, Steinkraus LW, Murad MH. Retracted article: The risk of prostate cancer in pilots: A meta-analysis. Vol. 86, *Aerospace Medicine and Human Performance*. Aerospace Medical Association; 2015. p. 112–7.
37. Ju-Kun S, Yuan DB, Rao HF, Chen TF, Luan BS, Xu XM, et al. Association between Cd Exposure and Risk of Prostate Cancer. *Med (United States)* [Internet]. 2016 Feb 1;95(6):e2708. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4753904&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Rider JR, Wilson KM, Sinnott JA, Kelly RS, Mucci LA, Giovannucci EL. Ejaculation Frequency and Risk of Prostate Cancer: Updated Results with an Additional Decade of Follow-up. *Eur Urol*. 2016 Dec 1;70(6):974–82.
39. Jiménez Cruz JF, Alonso Gorrea M. *Tratado de urología práctica*. Gregori; 1984.
40. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics.

- CA Cancer J Clin [Internet]. 2011 Mar 1;61(2):69–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20107>
41. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a Human Prostate Specific Antigen. *J Urol*. 2017 Feb 1;197(2):S148–52.
  42. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 1994;151(5):1283–90.
  43. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, et al. Prevention and early detection of prostate cancer [Internet]. Vol. 15, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2014. p. e484–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25281467/>
  44. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers [Internet]. Vol. 39, *Cellular Oncology*. Springer Netherlands; 2016. p. 97–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26790878/>
  45. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett ATK, et al. Serum prostate specific antigen complexed to  $\alpha$ 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* [Internet]. 1993;150(1):100–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7685416/>
  46. Oesterling JE, Cooner WH, Jacobsen SJ, Guess HA, Lieber MM. Influence of patient age on the serum PSA concentration: An important clinical observation. *Urol Clin North Am* [Internet]. 1993 Nov 1;20(4):671–80. Available from: <https://europepmc.org/article/med/7505975>
  47. Yanai Y, Kosaka T, Hongo H, Matsumoto K, Shinojima T, Kikuchi E, et al. Evaluation of prostate-specific antigen density in the diagnosis of prostate cancer combined with magnetic resonance imaging before biopsy in men aged 70 years and older with elevated PSA. *Mol Clin Oncol* [Internet]. 2018 Sep 19;9(6):656. Available from: [/pmc/articles/PMC6256262/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638910/)
  48. King MT, Nguyen PL, Boldbaatar N, Yang DD, Muralidhar V, Tempany CM, et al. Evaluating the influence of prostate-specific antigen kinetics on metastasis in men with PSA recurrence after partial gland therapy. *Brachytherapy* [Internet]. 2019 Mar 1;18(2):198–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638910/>
  49. Olleik G, Kassouf W, Aprikian A, Hu J, Vanhuysse M, Cury F, et al. Evaluation of new tests and interventions for prostate cancer management: A systematic review [Internet]. Vol. 16, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Harborside Press; 2018. p. 1340–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30442734/>
  50. Voigt JD, Dong Y, Linder V, Zappala S. Use of the 4Kscore test to predict the risk of aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy: Overall cost savings and improved quality of care to the us healthcare system. *Rev Urol* [Internet]. 2017;19(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522924>
  51. Narayan VM. A critical appraisal of biomarkers in prostate cancer. *World J Urol*

- [Internet]. 2020 Mar 1;38(3):547–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00345-019-02759-x>
52. Raja N, Russell CM, George AK. Urinary markers aiding in the detection and risk stratification of prostate cancer [Internet]. Vol. 7, *Translational Andrology and Urology*. AME Publishing Company; 2018. p. S436–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30363496/>
  53. Ahmed HU, El-Shater Bosaily A, Brown LC, Gabe R, Kaplan R, Parmar MK, et al. Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet* [Internet]. 2017 Feb 25;389(10071):815–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110982/>
  54. Brizmohun Appayya M, Adshead J, Ahmed HU, Allen C, Bainbridge A, Barrett T, et al. National implementation of multi-parametric magnetic resonance imaging for prostate cancer detection – recommendations from a UK consensus meeting [Internet]. Vol. 122, *BJU International*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 13–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29699001/>
  55. Litjens GJS, Barentsz JO, Karssemeijer N, Huisman HJ. Clinical evaluation of a computer-aided diagnosis system for determining cancer aggressiveness in prostate MRI. *Eur Radiol* [Internet]. 2015 Nov 1;25(11):3187–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26060063/>
  56. Barentsz JO, Weinreb JC, Verma S, Thoeny HC, Tempany CM, Shtern F, et al. Synopsis of the PI-RADS v2 Guidelines for Multiparametric Prostate Magnetic Resonance Imaging and Recommendations for Use [Internet]. Vol. 69, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2016. p. 41–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26361169/>
  57. Pagniez MA, Kasivisvanathan V, Puech P, Drumez E, Villers A, Olivier J. Predictive Factors of Missed Clinically Significant Prostate Cancers in Men with Negative Magnetic Resonance Imaging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol* [Internet]. 2020 Jul 1;204(1):24–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967522/>
  58. Hofman MS, Murphy DG, Williams SG, Nzenza T, Herschtal A, De Abreu Lourenco R, et al. A prospective randomized multicentre study of the impact of gallium-68 prostate-specific membrane antigen (PSMA) PET/CT imaging for staging high-risk prostate cancer prior to curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA study): clinical trial protocol. *BJU Int* [Internet]. 2018 Nov 1;122(5):783–93. Available from: [www.bjui.org](http://www.bjui.org)
  59. Donovan J, Hamdy F, Neal D, Peters T, Oliver S, Brindle L, et al. Prostate testing for cancer and treatment ( ProtecT ) feasibility study. Vol. 7, *Health Technology Assessment*. National Co-ordinating Centre for HTA; 2003.
  60. Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J. Diagnostic Value of Systematic Biopsy Methods in the Investigation of Prostate Cancer: A Systematic Review. Vol. 175, *Journal of Urology*. *J Urol*; 2006. p. 1605–12.
  61. Srigley JR, Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Yaxley J, Evans AJ. One is the new six: The International Society of Urological Pathology (ISUP) patient-focused

- approach to Gleason grading [Internet]. Vol. 10, Canadian Urological Association Journal. Canadian Urological Association; 2016. p. 339–41. Available from: [/pmc/articles/PMC5085914/](#)
62. D’Amico A V., Whittington R, Bruce Malkowicz S, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1998 Sep 16;280(11):969–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9749478/>
  63. Pinsky PF, Crawford ED, Kramer BS, Andriole GL, Gelmann EP, Grubb R, et al. Repeat prostate biopsy in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial. *BJU Int* [Internet]. 2007 Apr;99(4):775–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17223921/>
  64. Litwin MS, Tan HJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review [Internet]. Vol. 317, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2017. p. 2532–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655021/>
  65. Cimino S, Reale G, Castelli T, Favilla V, Giardina R, Russo GI, et al. Comparison between Briganti, Partin and MSKCC tools in predicting positive lymph nodes in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. Vol. 51, *Scandinavian Journal of Urology*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 345–50.
  66. Rodriguez-Covarrubias F, Sotomayor-de-Zavaleta M, Castillejos-Molina R, Gabilondo-Navarro F, Feria-Bernal G. [Comparison between surveillance, adjuvant radiotherapy, or salvage radiotherapy after radical prostatectomy in patients with prostate cancer (PCa) in stage pT3 or higher and/or positive surgical margins]. *Gac Med Mex*. 2014;150 Suppl:140–4.
  67. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics* [Internet]. 2013 Oct 8;14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24103217/>
  68. Blume-Jensen P, Berman DM, Rimm DL, Shipitsin M, Putzi M, Nifong TP, et al. Biology of Human Tumors Development and Clinical Validation of an In Situ Biopsy-Based Multimarker Assay for Risk Stratification in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015;21(11). Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
  69. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Apr 10;31(11):1428–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23460710/>
  70. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 May 17;19(5):575–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21575859/>
  71. Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, Koumakpayi IH, Katz RL, Khanna A, et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer

- outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* [Internet]. 2009 Aug;218(4):505–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19402094/>
72. Jiménez-Pacheco A, Peinado-Herreros JM, López-Luque A, Ibabe MCI. Nuevos marcadores urinarios en pacientes con cáncer de próstata. análisis de la problemática del screening. Vol. 140, *Revista Medica de Chile*. 2012. p. 686–7.
  73. Cano P, Godoy A, Escamilla R, Dhir R, Onate SA. Stromal-epithelial cell interactions and androgen receptor-coregulator recruitment is altered in the tissue microenvironment of prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):511–9.
  74. Arnold JT, Isaacs JT. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: It is not only the cancer cell's fault [Internet]. Vol. 9, *Endocrine-Related Cancer*. NIH Public Access; 2002. p. 61–73. Available from: </pmc/articles/PMC4124629/>
  75. Costa-Almeida R, Soares R, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration [Internet]. Vol. 12, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. John Wiley and Sons Ltd; 2018. p. 240–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28109062/>
  76. Niu YN, Xia SJ. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer [Internet]. Vol. 11, *Asian Journal of Andrology*. *Asian J Androl*; 2009. p. 28–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19098934/>
  77. Goldstein AS. A symbiotic relationship between epithelial and stromal stem cells [Internet]. Vol. 110, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences; 2013. p. 20356–7. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1320032110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1320032110)
  78. Stock D, Groome PA, Siemens DR. Inflammation and Prostate Cancer: A Future Target for Prevention and Therapy? [Internet]. Vol. 35, *Urologic Clinics of North America*. *Urol Clin North Am*; 2008. p. 117–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18061030/>
  79. McAlhany SJ, Ressler SJ, Larsen M, Tuxhorn JA, Yang F, Dang TD, et al. Promotion of Angiogenesis by ps20 in the Differential Reactive Stroma Prostate Cancer Xenograft Model. *Cancer Res*. 2003;63(18).
  80. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive Stroma in Human Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(9).
  81. Shiao SL, Chu GCY, Chung LWK. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment [Internet]. Vol. 380, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 340–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26828013/>
  82. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour - Host interface [Internet]. Vol. 411, *Nature*. *Nature*; 2001. p. 375–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11357145/>
  83. Wikström P, Ohlson N, Stattin P, Bergh A. Nuclear androgen receptors recur in the epithelial and stromal compartments of malignant and non-malignant human prostate tissue several months after castration therapy. *Prostate* [Internet]. 2007 Sep 1;67(12):1277–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20569>
  84. Bonollo F, Thalmann GN, Julio MK De, Karkampouna S. The role of cancer-

- associated fibroblasts in prostate cancer tumorigenesis. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020. p. 1–28.
85. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Res.* 1999;59(19).
  86. Jaeschke A, Jacobi A, Lawrence MG, Risbridger GP, Frydenberg M, Williams ED, et al. Cancer-associated fibroblasts of the prostate promote a compliant and more invasive phenotype in benign prostate epithelial cells. *Mater Today Bio* [Internet]. 2020 Sep 1;8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32984808/>
  87. Al. TJ et. Stromal Cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) Xenograft Model [Internet]. *Cancer Res.* 2002. p. 62(11). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/11335610\\_Stromal\\_Cells\\_Promote\\_Angiogenesis\\_and\\_Growth\\_of\\_Human\\_Prostate\\_Tumors\\_in\\_a\\_Differential\\_Reactive\\_Stroma\\_DRS\\_Xenograft\\_Model](https://www.researchgate.net/publication/11335610_Stromal_Cells_Promote_Angiogenesis_and_Growth_of_Human_Prostate_Tumors_in_a_Differential_Reactive_Stroma_DRS_Xenograft_Model)
  88. Thalmann GN, Rhee H, Sikes RA, Pathak S, Multani A, Zhou HE, et al. Human Prostate Fibroblasts Induce Growth and Confer Castration Resistance and Metastatic Potential in LNCaP Cells. *Eur Urol.* 2010 Jul;58(1):162–72.
  89. Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol* [Internet]. 2007 Jan 1;210(1):111–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20828>
  90. Levesque C, Nelson PS. Cellular constituents of the prostate stroma: Key contributors to prostate cancer progression and therapy resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2018 Aug 1;8(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28490538/>
  91. Taylor R, Risbridger G. Prostatic Tumor Stroma: A Key Player in Cancer Progression. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2008 Sep 3;8(6):490–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18781895/>
  92. Wein Alan K et al. *Urología [de] Campbell-Walsh : 10a edición*. Médica Panamericana; 2015.
  93. Shariat S, Scherr D, Gupta A, Bianco Jr F, Karakiewicz P, Zeltser I, et al. Biomarcadores emergentes para el diagnóstico, estadificación y pronóstico del cáncer de próstata. *Arch Españoles Urol* [Internet]. 2011;64(8):681–94. Available from: <https://medes.com/publication/70405>
  94. Rhim JS. In vitro human cell culture models for the study of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2000;3(4):229–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12497069/>
  95. Yasunaga Y, Nakamura K, Ko D, Srivastava S, Moul JW, Sesterhenn IA, et al. A novel human cancer culture model for the study of prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2001 Nov 29;20(55):8036–41. Available from: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)
  96. Buhler P WP et al. Primary prostate cancer cultures are models for androgen-independent transit amplifying cells. In: *Oncology reports* [Internet]. 2010. p. 465–

70. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/or/23/2/465>
97. Barclay WW, Woodruff RD, Hall MC, Cramer SD. A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Endocrinology* [Internet]. 2005 Jan;146(1):13–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15471963/>
98. Fernandez-Gomez JM, Eiro N, García-Rodríguez JJ, Quintás-Blanco A, Gonzalez-Ruiz de León C, Perez de Haro ML, et al. Metalloproteinase 11, potential marker and molecular target in advanced and castration-resistant prostate cancer. Culture study of peritumoral fibroblasts. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2017 Jul 1;41(6):376–82. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-actas-urológicas-espanolas-292-articulo-metaloproteinasa-11-potencial-marcador-diana-S0210480616302078>
99. Choi SYC, Lin D, Gout PW, Collins CC, Xu Y, Wang Y. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer [Internet]. Vol. 79, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2014. p. 222–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305336/>
100. Gravina GL, Mancini A, Ranieri G, Pasquale B Di, Marampon F, Clemente L Di, et al. Phenotypic characterization of human prostatic stromal cells in primary cultures derived from human tissue samples. *Int J Oncol* [Internet]. 2013 Jun;42(6):2116–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23589051/>
101. Eiro N, Fernandez-Gomez J, Sacristán R, Fernandez-Garcia B, Lobo B, Gonzalez-Suarez J, et al. Stromal factors involved in human prostate cancer development, progression and castration resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 Feb 1;143(2):351–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-016-2284-3>
102. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* [Internet]. 2012 May 1;33(5):887–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22046>
103. Beilin J, Ball EMA, Favalaro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: Specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(1):85–96.
104. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3320–3.
105. Gelmann E. *Molecular Biology of the Androgen Receptor*. *Artic J Clin Oncol* [Internet]. 2002; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/11286774>
106. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Vol. 25, *Endocrine Reviews*. *Endocr Rev*; 2004. p. 276–308.
107. Denis L, Cáncer GM-, 1993 U. Descripción general de los ensayos de fase III sobre el tratamiento con andrógenos combinados en pacientes con cáncer de próstata metastásico. *Bibl en línea Wiley* [Internet]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097->

0142(19931215)72:12%2B%3C3888::AID-CNCR2820721726%3E3.0.CO;2-B

108. Trachtenberg J, Blackledge G. Looking to the future: Advances in the management of hormone-refractory prostate cancer. *Eur Urol Suppl.* 2002 Oct 1;1(7):44–53.
109. Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. Vol. 360, *Molecular and Cellular Endocrinology. Mol Cell Endocrinol*; 2012. p. 38–43.
110. Azad AA, Volik S V., Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: Biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 May 15;21(10):2315–24.
111. Korpala M, Korn JM, Gao X, Rakiec DP, Ruddy DA, Doshi S, et al. An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (Enzalutamide). *Cancer Discov.* 2013 Sep;3(9):1030–43.
112. Romanel A, Tandefelt DG, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, et al. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2015 Nov 4;7(312).
113. Goldstein A, Toro PV, Lee J, Silberstein JL, Nakazawa M, Waters I, et al. Detection fidelity of AR mutations in plasma derived cell-free DNA. *Oncotarget.* 2017;8(9):15651–62.
114. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995;9(4):401–6.
115. Dr. Roberto Llarena. *Cáncer de Próstata Resistente a la Castración.* 2016.
116. Szwarc MM, Kommagani R, Lessey BA, Lydon JP. The p160/Steroid Receptor Coactivator Family: Potent Arbiters of Uterine Physiology and Dysfunction1. *Biol Reprod.* 2014 Nov 1;91(5).
117. Agoulnik IU, Vaid A, Bingman WE, Erdeme H, Frolov A, Smith CL, et al. Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7959–67.
118. Qin J, Lee HJ, Wu SP, Lin SC, Lanz RB, Creighton CJ, et al. Androgen deprivation-induced NCoA2 promotes metastatic and castration-resistant prostate cancer. *J Clin Invest.* 2014 Nov 3;124(11):5013–26.
119. Tien JCY, Liu Z, Liao L, Wang F, Xu Y, Wu YL, et al. The steroid receptor coactivator-3 is required for the development of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2013 Jul 1;73(13):3997–4008.
120. Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, et al. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate [Internet].* 2009 Apr 1;70(5):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.21088>
121. McGrath MJ, Binge LC, Sriratana A, Wang H, Robinson PA, Pook D, et al. Regulation of the transcriptional coactivator FHL2 licenses activation of the androgen receptor in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2013 Aug

- 15;73(16):5066–79.
122. van der Steen T, Tindall DJ, Huang H. Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2013. p. 14833–59.
  123. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):16–22.
  124. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, et al. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*. 2011;6(4).
  125. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, et al. Androgen receptor splice variant 7 and efficacy of taxane chemotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol*. 2015 Aug 1;1(5):582–91.
  126. Li H, Wang Z, Xiao W, Yan L, Guan W, Hu Z, et al. Androgen-receptor splice variant-7-positive prostate cancer: A novel molecular subtype with markedly worse androgen-deprivation therapy outcomes in newly diagnosed patients. *Mod Pathol*. 2018 Jan 1;31(1):198–208.
  127. DICKSON RB, LIPPMAN ME. Growth Factors in Breast Cancer. *Endocr Rev* [Internet]. 1995 Oct 1;16(5):559–89. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-16-5-559>
  128. Barbeito CG, Laube PA. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO. ASPECTOS BÁSICOS Y POTENCIALIDADES TERAPÉUTICAS. Vol. 25, C. Barbeito y col. 8 *ANALECTA VETERINARIA*. 2005.
  129. Wang C, Liu Z, Ke Y, Wang F. Intrinsic FGFR2 and ectopic FGFR1 signaling in the prostate and prostate cancer [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; 2019. Available from: [/pmc/articles/PMC6363687/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111111/)
  130. Wang F. Modeling human prostate cancer in genetically engineered mice. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2011. p. 1–49.
  131. Portela-Gomes GM, Lukinius A, Grimelius L. Synaptic vesicle protein 2, a new neuroendocrine cell marker. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;157(4):1299–309. Available from: [/pmc/articles/PMC1850151/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)
  132. Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer [Internet]. Vol. 11, *Endocrine-Related Cancer*. Endocr Relat Cancer; 2004. p. 709–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613447/>
  133. Teishima J, Hayashi T, Nagamatsu H, Shoji K, Shikuma H, Yamanaka R, et al. Fibroblast Growth Factor Family in the Progression of Prostate Cancer. *J Clin Med* [Internet]. 2019 Feb 4;8(2):183. Available from: [/pmc/articles/PMC6406580/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)
  134. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM.

- Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Jun 9;281(23):15694–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16597617/>
135. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the fgf receptor multigene family. *Adv Cancer Res* [Internet]. 1992 Jan 1;60(C):1–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8417497/>
  136. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* [Internet]. 1991 Feb 22;64(4):841–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1847668/>
  137. Bashkin P, Neufeld G, Gitay-Goren H, Vlodaysky I. Release of cell surface-associated basic fibroblast growth factor by glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Cell Physiol* [Internet]. 1992;151(1):126–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1313817/>
  138. Saksela O, Laiho M. Growth factors and the extracellular matrix [Internet]. Vol. 106, *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja. FASEB J*; 1990. p. 297–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9034166/>
  139. TE Hardingham AF. Proteoglicanos: muchas formas y muchas funciones - PubMed [Internet]. *Faseb J*. 1992. p. 6 (3): 861-70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1740236/>
  140. Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in Expression of Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) 2 and Its Receptor FGFR-1 in Human Prostate Cancer 1. 1999.
  141. SWINNEN K, CAILLEAU J, HEYNS W, VERHOEVEN G. Prostatic Stromal Cells and Testicular Peritubular Cells Produce Similar Paracrine Mediators of Androgen Action\*. *Endocrinology* [Internet]. 1990 Jan 1;126(1):142–50. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-126-1-142>
  142. Fernando J, Arcila U. Cáncer de Próstata ¿Por qué se produce el cáncer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular Premio José Armando López Mejor Artículo de la Revista Urología Colombiana.
  143. Gospodarowicz D, Bialecki H GG. Purification of the Fibroblast Growth Factor Activity From Bovine Brain - PubMed [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/649600/>
  144. Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1986 Jul 31;138(2):644–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3741426/>
  145. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A et al. Factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos: secuencia de nucleótidos y organización genómica - PubMed [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3780670/>
  146. Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, et al. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative

- CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989;86(6):1836–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2538817/>
147. Givol D and YA. Complejidad de los receptores de FGF: bases genéticas para la diversidad estructural y la especificidad funcional - PubMed [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1464370/>
  148. McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, D'Amore PA. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1989;109(2):811–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2760113/>
  149. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* (80- ) [Internet]. 1987 Jan 23 [cited 2020 Jul 11];235(4787):442–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/235/4787/442>
  150. Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: Potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* [Internet]. 1991;47(3):236–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1724246/>
  151. Folkman J. ANGIOGENESIS: INITIATION AND CONTROL. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1982 Jan 1 [cited 2020 Jul 11];401(1):212–26. Available from: <https://europepmc.org/article/med/6188401>
  152. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* [Internet]. 1966;164(3):491–502. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1477290/>
  153. Basilico C, Moscatelli D. The fgf family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*. 1992 Jan 1;59(C):115–65.
  154. Mira-Lopez YR, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB, Ossowski L. Identification of a pituitary factor responsible for enhancement of plasminogen activator activity in breast tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1986;83(20):7780–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3463998/>
  155. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor [Internet]. Vol. 77, *Journal of Molecular Medicine*. *J Mol Med (Berl)*; 1999. p. 527–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10494799/>
  156. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* [Internet]. 1987;8(3):338–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3308446/>
  157. Story MT, Jacobs SC, Lawson RK, Sasse J. Prostatic Growth Factor: Purification and Structural Relationship to Basic Fibroblast Growth Factor. *Biochemistry* [Internet]. 1987;26(13):3843–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3307914/>
  158. McKeehan WL, Adams PS, Fast D. Different hormonal requirements for androgen-independent growth of normal and tumor epithelial cells from rat prostate. *Vitr Cell Dev Biol* [Internet]. 1987 Feb [cited 2020 Jul 11];23(2):147–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3546251/>
  159. Levine AC, Ren M, Huber GK, Kirschenbaum A. The effect of androgen, estrogen, and growth factors on the proliferation of cultured fibroblasts derived from human

- fetal and adult prostates. *Endocrinology* [Internet]. 1992;130(4):2413–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1372243/>
160. Nakamoto T, Chang C, Li A, Chodak GW. Basic Fibroblast Growth Factor in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 1992;52(3).
  161. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2\* [Internet]. 1997. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-abstract/18/1/26/2530675>
  162. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeehan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1993 Aug;13(8):4513–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7687739/>
  163. Saksela O, Moscatelli D, Rifkin DB. The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1987;105(2):957–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3114269/>
  164. Russell PJ, Bennett S, Joshua A, Yu Y, Downing SR, Hill MA, et al. Elevated expression of FGF-2 does not cause prostate cancer progression in LNCaP cells. *Prostate* [Internet]. 1999 Jun 15;40(1):1–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%28SICI%291097-0045%2819990615%2940%3A1%3C1%3A%3AAID-PROS1%3E3.0.CO%3B2-K>
  165. Abdollahi A et al. SU5416 y SU6668 atenúan los efectos angiogénicos de la producción de factor de crecimiento de células tumorales inducidas por radiación y amplifican la acción antideotelial directa de la radiación in vitro - PubMed [Internet]. *Cancer Research* 2003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12839971/>
  166. Pecqueux C, Arslan A, Heller M, Falkenstein M, Kaczorowski A, Tolstov Y, et al. FGF-2 is a driving force for chromosomal instability and a stromal factor associated with adverse clinico-pathological features in prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2018 Aug 1;36(8):365.e15-365.e26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29887238/>
  167. Ropiquet F, Huguenin S, Villette JM, Ronflé V, Le Brun G, Maitland NJ, et al. FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells. *Int J Cancer* [Internet]. 1999;82(2):237–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10389758/>
  168. Niu J, Chang Z, Peng B, Xia Q, Lu W, Huang P, et al. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-κB transcription factors. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Mar 2;282(9):6001–11. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820522072/fulltext>
  169. Huang T, Wang L, Dian L, Piao L, Xiong H, Zhuang L, et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1. *Int J Oncol* [Internet]. 2017 May 1;50(5):1501–12. Available

from: /pmc/articles/PMC5403236/

170. Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J, Shimkets R. Fibroblast growth factor 7: An inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing tumors. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2005 Feb;90(2):1012–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15562028/>
171. Huang YW, Wang LS, Chang HL, Ye W, Shu S, Sugimoto Y, et al. Effect of keratinocyte growth factor on cell viability in primary cultured human prostate cancer stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2006 Jul;100(1–3):24–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16854582/>
172. Ropiquet F, Giri D, Lamb DJ IM. FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation. [Internet]. *J Urol*. p. 162(2):595-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10411093/>
173. Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS. Upregulation of estrogen and androgen receptors modulate expression of FGF-2 and FGF-7 in human, cultured, prostatic stromal cells exposed to high concentrations of estradiol. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2002;5(2):105–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496997/>
174. Planz B, Oltean H, Deix T, Kirley SD, Wang QF, McDougal WS, et al. Effect of keratinocyte growth factor and activin on cell growth in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *World J Urol* [Internet]. 2004;22(2):140–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14991321/>
175. Kurganovs N et al. The role of FGF7 in castration-resistant prostate cancer [Internet]. *BJU International*. 2017. Available from: <http://knowledgebank.epworth.org.au/epworthjspui/handle/11434/1248>
176. Mikolajczak M. Identification and analysis of a novel nuclear role of Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10). *Br Libr* [Internet]. 2016; Available from: <https://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/61049/>
177. Qazvini FF. Significant Functions of Fibroblast Growth Factor-10: A Narrative Review. *Cambridge Med J*. 2019 Jul;
178. Matsuike A, Ishiwata T, Asano G, Watanabe M. Expression of Fibroblast Growth Factor (FGF)-10 in Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *J Nippon Med Sch*. 2001;68(5):397–404.
179. Clayton NS, Grose RP. Emerging Roles of Fibroblast Growth Factor 10 in Cancer. *Front Genet* [Internet]. 2018 Oct 24;9:499. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00499/full>
180. Bagai S, Rubio E, Cheng JF, Sweet R, Thomas R, Fuchs E, et al. Fibroblast growth factor-10 is a mitogen for urothelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jun 28;277(26):23828–37. Available from: <http://www.jbc.org>
181. Lu W, Luo Y, Kan M, McKeenan WL. Fibroblast growth factor-10: A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Apr 30;274(18):12827–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10212269/>
182. Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Schmidt K, Ittmann M. FGF-10 is expressed

- at low levels in the human prostate. *Prostate* [Internet]. 2000;44(4):334–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10951499/>
183. Memarzadeh S, Xin L, Mulholland DJ, Mansukhani A, Wu H, Teitell MA, et al. Enhanced Paracrine FGF10 Expression Promotes Formation of Multifocal Prostate Adenocarcinoma and an Increase in Epithelial Androgen Receptor. *Cancer Cell* [Internet]. 2007 Dec 6;12(6):572–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18068633/>
  184. Ricke EA, Williams K, Lee YF, Couto S, Wang Y, Hayward SW, et al. Androgen hormone action in prostatic carcinogenesis: Stromal androgen receptors mediate prostate cancer progression, malignant transformation and metastasis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2012 Jul;33(7):1391–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22535887/>
  185. Hinck AP. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - Insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. Vol. 586, *FEBS Letters*. Elsevier B.V.; 2012. p. 1860–70.
  186. Ávila-Rodríguez D, Segura-Villalobos DL, Ibarra-Sánchez A, González-Espinosa C, Macías-Silva M. TGF- $\beta$  y células cebadas: reguladores del desarrollo del tumor. *TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas* [Internet]. 2020 Feb 7;23. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2020000100200&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2020000100200&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  187. Massague J. The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annu Rev Cell Biol* [Internet]. 1990 Nov 28 [cited 2020 Oct 23];6(1):597–641. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.06.110190.003121>
  188. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: Vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity [Internet]. Vol. 8, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 1997. p. 21–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9174661/>
  189. Alonso-Magdalena P, Brössner C, Reiner A, Cheng G, Sugiyama N, Warner M, et al. A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Feb 24;106(8):2859–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19196965/>
  190. Pellinen T, Blom S, Sánchez S, Välimäki K, Mpindi JP, Azegrouz H, et al. ITGB1-dependent upregulation of Caveolin-1 switches TGF $\beta$  signalling from tumour-suppressive to oncogenic in prostate cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1;8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29402961/>
  191. Wilson TJ, Singh RK. Proteases as modulators of tumor-stromal interaction: Primary tumors to bone metastases [Internet]. Vol. 1785, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. NIH Public Access; 2008. p. 85–95. Available from: </pmc/articles/PMC2418859/?report=abstract>
  192. Wan X, Li ZG, Yingling JM, Yang J, Starbuck MW, Ravoori MK, et al. Effect of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) receptor I kinase inhibitor on prostate cancer bone growth. *Bone*. 2012 Mar 1;50(3):695–703.
  193. Neel J-C, Humbert L, Lebrun J-J. The Dual Role of TGF $\beta$  in Human Cancer: From

- Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol.* 2012 Dec 24;2012:1–28.
194. Oscar Peralta-Zaragoza AL-M et al. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer [Internet]. *Salud Publica Mex.* 2001. p. 43: 340-351. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342001000400011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342001000400011)
  195. Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: A perspective. *Vet Pathol* [Internet]. 2010 Jan 1;47(1):77–97. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985809352981>
  196. Okazaki R, Sakai A, Uezono Y, Ootsuyama A, Kunugita N, Nakamura T, et al. Sequential changes in transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TGF- $\beta$ 1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbit knees. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(4):228–35.
  197. Choi ME. Mechanism of transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling: Role of the mitogen-activated protein kinase. Vol. 58, *Kidney International, Supplement.* Blackwell Publishing Inc.; 2000. p. S53–8.
  198. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1986;83(12):4167–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2424019/>
  199. PALLADINO MA, MORRIS RE, STARNES HF, LEVINSON AD. The Transforming Growth Factor-Betas: A New Family of Immunoregulatory Molecules. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1990 Jan 1;593(1):181–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/2197960>
  200. Filmus J, Kerbel RS. Development of resistance mechanisms to the growth-inhibitory effects of transforming growth factor- $\beta$  during tumor progression [Internet]. Vol. 5, *Current Opinion in Oncology.* 1993. p. 123–9. Available from: <https://europepmc.org/article/med/8427884>
  201. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- $\beta$  signaling in cancer - A double-edged sword [Internet]. Vol. 11, *Trends in Cell Biology.* Trends Cell Biol; 2001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11684442/>
  202. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate [Internet]. Vol. 107, *International Journal of Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2003. p. 1–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.11335>
  203. Korkaya H, Kim G Il, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, et al. Activation of an IL6 Inflammatory Loop Mediates Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer by Expanding the Cancer Stem Cell Population. *Mol Cell* [Internet]. 2012 Aug 24;47(4):570–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22819326/>
  204. Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, et al. Distinct mechanisms of TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-to- mesenchymal transition and

- metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 Jul 1;115(7):1714–23. Available from: <http://www.jci.org>
205. Steiner MS. Transforming growth factor- $\beta$  and prostate cancer. *World J Urol* [Internet]. 1995 Dec;13(6):329–36. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00191213>
  206. Zhang F, Lee J, Lu S, Pettaway CA, Dong Z. Blockade of transforming growth factor- $\beta$  signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Jun 15;11(12):4512–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15958637/>
  207. Fontana A, Pfister HW, Frei K, Malipiero U. Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1992;99(1):1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1483057/>
  208. Roberts AB, Sporn MB. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF- $\beta$ . Vol. 140, *American Review of Respiratory Disease*. American Lung Association; 1989. p. 1126–8.
  209. Story MT, Hopp KA, Meier DA. Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stromal cells. *Prostate* [Internet]. 1996 Apr;28(4):219–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8602397/>
  210. Lu T, Burdelya LG, Swiatkowski SM, Boiko AD, Howe PH, Stark GR, et al. Secreted transforming growth factor  $\beta$ 2 activates NF- $\kappa$ B, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 May 4;101(18):7112–7. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402048101](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402048101)
  211. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression [Internet]. Vol. 29, *Nature Genetics*. Nat Genet; 2001. p. 117–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11586292/>
  212. Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, Andrews B, Zhu K, Wheeler TM, et al. Association of Pre- and Postoperative Plasma Levels of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Interleukin 6 and Its Soluble Receptor with Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004 Mar 15;10(6):1992–9. Available from: [www.urol.bcm.tmc.edu](http://www.urol.bcm.tmc.edu).
  213. Rosenberg EE, Gerashchenko G V, Hryshchenko N V, Mevs L V, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. EXPRESSION OF CANCER-ASSOCIATED GENES IN PROSTATE TUMORS [Internet]. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України; 2017. Available from: [www.openepi.com/](http://www.openepi.com/)
  214. Brand TC, Bermejo C, Canby-Hagino E, Troyer DA, Baillargeon J, Thompson IM, et al. Association of polymorphisms in TGFB1 and prostate cancer prognosis. *J Urol* [Internet]. 2008;179(2):754–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082198/>
  215. Ewart-Toland A, Chan JM, Yuan J, Balmain A, Ma J. A Gain of Function TGFB1 Polymorphism May Be Associated With Late Stage Prostate Cancer. 2008.

216. Whang YM, Jung SP, Kim MK, Chang IH, Park SI. Targeting the hepatocyte growth factor and c-met signaling axis in bone metastases [Internet]. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019. Available from: [/pmc/articles/PMC6359064/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/359064/)
217. Nishimura K, Arichi N, Tokugawa S, Yoshioka I, Namba Y, Kishikawa H, et al. Hepatocyte growth factor and interleukin-6 in combination with prostate volume are possible prostate cancer tumor markers in patients with gray-zone PSA levels. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008;11(3):258–63.
218. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy [Internet]. Vol. 16, Expert Opinion on Therapeutic Targets. Expert Opin Ther Targets; 2012. p. 553–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22530990/>
219. Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, Firuzi O. HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers [Internet]. Vol. 56, Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 533–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31512514/>
220. Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu HM, You X, Vaughan ED, et al. Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Pathol.* 2001;159(2):579–90.
221. Fryczkowski M, Bułdak RJ, Hejmo T, Kukla M, Zwirska-Korczala K. Circulating Levels of Omentin, Leptin, VEGF, and HGF and Their Clinical Relevance with PSA Marker in Prostate Cancer. *Dis Markers.* 2018;2018.
222. Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF. Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008;14(22):7385–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19010854/>
223. Maeda A, Nakashiro K ichi, Hara S, Sasaki T, Miwa Y, Tanji N, et al. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006;347(4):1158–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16870139/>
224. Han Y, Luo Y, Wang Y, Chen Y, Li M, Jiang Y. Hepatocyte growth factor increases the invasive potential of PC-3 human prostate cancer cells via an ERK/MAPK and ZEB-1 signaling pathway. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Jan 1;11(1):753–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26870279/>
225. Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 1995 Aug 1;147(2):386–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7639332/?tool=EBI>
226. Sachiyo N; Yoshihiko H et al. Expression of Hepatocyte Growth Factor in Prostate Cancer May Indicate a Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy [Internet]. *Anticancer Research* 2015. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/35/1/413.short>
227. Dayyani F, Zurita AJ, Nogueras-González GM, Slack R, Millikan RE, Araujo JC,

- et al. The combination of serum insulin, osteopontin, and hepatocyte growth factor predicts time to castration-resistant progression in androgen dependent metastatic prostate cancer- an exploratory study. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Sep 6;16(1):721. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2723-1>
228. Tu WH, Zhu C, Clark C, Christensen JG, Sun Z. Efficacy of c-Met inhibitor for advanced prostate cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Oct 14;10:556. Available from: [/pmc/articles/PMC2964640/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2964640/?report=abstract)
229. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: Expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* [Internet]. 2006 Dec 12;6(1):186. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-6-186>
230. Martin TA, Mason MD, Jiang WG. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2014 Jul 1;32(1):213–24. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2014.3219/abstract>
231. Al. CVCB et. FGF-2 and HGF reverse abiraterone effect on intracellular levels of DHT in androgen-dependent and androgen independent prostate cancer cell lines [Internet]. *JBUON* 2020; 25 (2): 1141-1147. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/342131577\\_FGF-2\\_and\\_HGF\\_reverse\\_abiraterone's\\_effect\\_on\\_intracellular\\_levels\\_of\\_DHT\\_in\\_androgen-dependent\\_and\\_androgen\\_independent\\_prostate\\_cancer\\_cell\\_lines](https://www.researchgate.net/publication/342131577_FGF-2_and_HGF_reverse_abiraterone's_effect_on_intracellular_levels_of_DHT_in_androgen-dependent_and_androgen_independent_prostate_cancer_cell_lines)
232. Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR. Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: Correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1991 Feb;20(1):11–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1667486/>
233. Heldin CH, Eriksson U, Östman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2002 Feb 15;398(2):284–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11831861/>
234. Valle M del, Maestro A, García-Suárez O, Rodríguez L, Medina B, Vega J. Distribución de los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFRalfa y PDGFRBeta) en el sistema músculo-esquelético. *Patol apar locomot Fund Mapfre Med*. 2006;4:3–11.
235. Judith Meza-Junco et al. [Base molecular del cáncer] - PubMed [Internet]. *Revista de investigación clínica* vol58, n1, 2006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16789600/>
236. Acevedo G. A. Metástasis óseas del cáncer de mama. *Medwave* [Internet]. 2005 May 1;2005(4). Available from: [/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3588](http://link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3588)
237. Tan W. Novel promising treatment options for metastatic androgen independent prostate cancer. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2007 Jan 1;31(6):680–5. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-actas-urológicas-espanolas-292-articulo-novedades-el-tratamiento-del-cancer-S0210480607737051>
238. Hofer MD, Fecko A, Shen R, Setlur SR, Pienta KG, Tomlins SA, et al. Expression of the platelet-derived growth factor receptor in prostate cancer and treatment implications with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia*. 2004 Sep 1;6(5):503–12.

239. Johansson A, Jones J, Pietras K, Kilter S, Skytt Å, Rudolfsson SH, et al. A stroma targeted therapy enhances castration effects in a transplantable rat prostate cancer model. *Prostate* [Internet]. 2007 Nov 1;67(15):1664–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17854058/>
240. Hoch R V., Soriano P. Roles of PDGF in animal development [Internet]. Vol. 130, *Development*. Development; 2003. p. 4769–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12952899/>
241. Nordby Y, Richardsen E, Rakaee M, Ness N, Donnem T, Patel HRH, et al. High expression of PDGFR- $\beta$  in prostate cancer stroma is independently associated with clinical and biochemical prostate cancer recurrence. *Sci Rep*. 2017 Feb 24;7.
242. Westermarck B, Heldin CH. Platelet-derived growth factor structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol (Madr)* [Internet]. 1993;32(2):101–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8323751/>
243. Pullen MA, Thomas K, Wu HL, Nambi P. Stimulation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor bb in human prostate smooth muscle cells. *Pharmacology* [Internet]. 2001;62(2):103–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11174080/>
244. Vlahos CJ, Kriauciunas TD, Gleason PE, Jones JA, Eble JN, Salvas D, et al. Platelet-derived growth factor induces proliferation of hyperplastic human prostatic stromal cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 1993 Aug 1;52(4):404–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.240520405>
245. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Roth M, Block LH. Platelet-derived growth factor stimulates the secretion of hyaluronic acid by proliferating human vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Oct 10;92(21):9881–5. Available from: [/pmc/articles/PMC40906/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/140906/)
246. Skarmoutsos A, Skarmoutsos I, Katafigiotis I, Tatakis E, Giagini A, Alamanis C, et al. Detecting Novel Urine Biomarkers for the Early Diagnosis of Prostate Cancer: Platelet Derived Growth Factor-BB as a Possible New Target. *Curr Urol*. 2018 Oct 1;12(1):13–9.
247. Najy AJ, Dyson G, Jena BP, Lin CY, Kim HRC. Matriptase activation and shedding through PDGF-D-mediated extracellular acidosis. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2016 Feb 15;310(4):C293–304. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26157007/>
248. Zhang Y, Wang D, Li M, Wei X, Liu S, Zhao M, et al. Quantitative Proteomics of TRAMP Mice Combined with Bioinformatics Analysis Reveals That PDGF-B Regulatory Network Plays a Key Role in Prostate Cancer Progression. *J Proteome Res* [Internet]. 2018 Jul 6;17(7):2401–11. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jproteome.8b00158>
249. Cheng J, Ye H, Liu Z, Xu C, Zhang Z, Liu Y, et al. Platelet-derived growth factor-BB accelerates prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2013 Jul 1;114(7):1510–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24492>
250. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment [Internet]. Vol. 141, *Cell*. Cell; 2010. p. 52–67.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371345/>

251. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2010 Mar 16;102(5):922–9. Available from: [www.bjcancer.com](http://www.bjcancer.com)
252. Coronato S, Laguens G, Girolamo VD, Inmunología C de. ROL DE LAS METALOPROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES EN PATOLOGÍA TUMORAL. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2012;72:495–502. Available from: ISSN 0025-7680
253. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [Internet]. Vol. 2, *Nature Reviews Cancer*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 2002. p. 161–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11990853/>
254. Zapico JM SP et al. Síntesis de Inhibidores Selectivos de MMP-2 Utilizando Química Click - Dialnet [Internet]. 2011. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4098303>
255. Silva SA, Gobbo MG, Pinto-Fochi ME, Rafacho A, Taboga SR, Almeida EA, et al. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. *Int J Exp Pathol*. 2015 Feb 1;96(1):21–30.
256. Kaminski A, Hahne JC, Haddouti ELM, Florin A, Wellmann A, Wernert N. Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2006;18(5):941–50.
257. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 2004. p. 71–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14708027/>
258. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RA, Kallakury BVS. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2003 Mar 1;16(3):198–205. Available from: <https://europepmc.org/article/med/12640098>
259. Gioia M, Monaco S, Fasciglione GF, Coletti A, Modesti A, Marini S, et al. Characterization of the Mechanisms by which Gelatinase A, Neutrophil Collagenase, and Membrane-Type Metalloproteinase MMP-14 Recognize Collagen I and Enzymatically Process the Two  $\alpha$ -Chains. *J Mol Biol* [Internet]. 2007 May 11;368(4):1101–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379243/>
260. Dick W, Zhu C, Björkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the *Ldlr*<sup>-/-</sup>*-Apob100/100* mouse. *Int J Mol Med* [Internet]. 2011 Aug;28(2):247–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21567073/>
261. Fainardi E, Castellazzi M, Tamborino C, Trentini A, Manfrinato MC, Baldi E, et al. Potential relevance of cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal synthesis of active matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as markers of disease

- remission in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2009;15(5):547–54.
262. Wadowska-Jaszczyńska K, Jach R, Stangel-Wójcikiewicz K, Kabzińska-Turek M, Przybylska P, Basta A, et al. Results in treatment of early breast cancers and the level of selected metalloproteinases [Internet]. Vol. 32, *Neuroendocrinology Letters*. 2011. Available from: [www.nel.edu](http://www.nel.edu)
  263. Xie T, Dong B, Yan Y, Hu G, Xu Y. Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. *Biomed Reports* [Internet]. 2016 Feb 1;4(2):241–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26893846/>
  264. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tétu B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res.* 2003;63(23):8511–5.
  265. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González JM, et al. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol* [Internet]. 2011 Oct;29(5):657–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20886218/>
  266. Murray NP, Reyes E, Badinez L, Orellana N, Fuentealba C, Olivares R, et al. Effect of androgen blockade on her-2 and matrix metalloproteinase-2 expression on bone marrow micrometastasis and stromal cells in men with prostate cancer. *Sci World J* [Internet]. 2013;2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23766685/>
  267. Chen EI, Li W, Godzik A, Howard EW, Smith JW. A residue in the S2 subsite controls substrate selectivity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 May 9;278(19):17158–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12591933/>
  268. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers [Internet]. Vol. 87, *Biochimie*. Elsevier; 2005. p. 287–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15781315/>
  269. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, Partridge JJ, Madsen MA, Hahn-Dantona EA, et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* [Internet]. 2006 Jan 1;107(1):317–27. Available from: [/pmc/articles/PMC1895349/](http://pmc/articles/PMC1895349/)
  270. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2007 Mar 26;96(6):903–11. Available from: [www.bjcancer.com](http://www.bjcancer.com)
  271. Eiro N, Cid S, Fraile M, Vizoso FJ. Importance of investigating tumour stroma in breast cancer [Internet]. Vol. 32, *Revista de Senologia y Patología Mamaria*. Elsevier Doyma; 2019. p. 17–25. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-importancia-investigacion-sobre-el-estroma-S0214158219300015>
  272. Angelina di carlo et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the urine of prostate cancer patients. *Oncol Rep.* 2010 May 27;24(1).

273. Rodriguez IG, Del Fresno MR, Ugarteburu RG, Arriaga PG, Lopez Cima F, Samoano AF, et al. Expresión de metaloproteasa de matriz 9 en el cáncer de próstata. Experiencia preliminar. *Arch Esp Urol*. 2010 Mar;63(2):119–24.
274. Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F, Gangemi P, et al. Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 Nov 15;14(22):7470–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19010864/>
275. Ok Atılgan A, Özdemir BH, Yılmaz Akçay E, Tepeoğlu M, Börcek P, Dirim A. Association between focal adhesion kinase and matrix metalloproteinase-9 expression in prostate adenocarcinoma and their influence on the progression of prostatic adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2020 Apr 1;45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32106037/>
276. Skerenova M, Mikulova V, Capoun O, Zima T, Tesarova P. Circulating tumor cells and serum levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF as markers of the metastatic process in patients with high risk of metastatic progression. *Biomed Pap* [Internet]. 2017 Sep 1;161(3):272–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529342/>
277. Mandel A, Larsson P, Sarwar M, Semenas J, Syed Khaja AS, Persson JL. The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Mol Med* [Internet]. 2018 Jun 27;24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134822/>
278. Pego ER, Fernández I, Núñez MJ. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: A review [Internet]. Vol. 36, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier Inc.; 2018. p. 272–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650324/>
279. Eiro N, Gonzalez LO, Fraile M, Cid S, Schneider J, Vizoso FJ. Breast cancer tumor stroma: Cellular components, phenotypic heterogeneity, intercellular communication, prognostic implications and therapeutic opportunities [Internet]. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019. p. 1–26. Available from: </pmc/articles/PMC6562436/>
280. Basset P, Wolf C, Chambon P. Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1993 Oct;24(3):185–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01833259>
281. Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noël A, Chenard MP, Wolf C, et al. Stromelysin-3: A paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 1997;26(1):43–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9246540/>
282. Masson R, Lefebvre O, Noël A, El Fahime M, Chenard MP, Wendling C, et al. In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol* [Internet]. 1998 Mar 23;140(6):1535–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9508784/>
283. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S, González JM, et al. Comparative study of stromal metalloproteases expression in patients

- with benign hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2011 Mar;137(3):551–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20508949/>
284. Nonsrijun N, Mitchai J, Brown K, Leksomboon R, Tuamsuk P. Overexpression of matrix metalloproteinase 11 in thai prostatic adenocarcinoma is associated with poor survival. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2013;14(5):3331–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.5.3331>
285. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer [Internet]. Vol. 32, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018. p. 1105–40. Available from: <http://pmc/articles/PMC6120714/>
286. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality Results from a Randomized Prostate-Cancer Screening Trial. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Mar 26;360(13):1310–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297565/>
287. Ishii K, Imamura T, Iguchi K, Arase S, Yoshio Y, Arima K, et al. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth in vivo. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2009 Jun;16(2):415–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19293288/>
288. Sasaki T, Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, et al. Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Lab Invest* [Internet]. 2016 Mar 1;96(3):338–49. Available from: [www.laboratoryinvestigation.org](http://www.laboratoryinvestigation.org)

## **10. Anexos**

---



## ANEXO I

Nombre del Médico que le informa: ..... Fecha: .....

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:**

#### **“CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DEL ESTROMA PROSTÁTICO NORMAL, TUMORAL E HIPERPLÁSICO ESTUDIADO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES”**

Se le solicita permiso para participar en el estudio de investigación titulado: “Características diferenciales del estroma prostático normal, tumoral e hiperplásico estudiado mediante cultivos celulares”, cuyo investigador principal es el Dr. Jesús M. Fernández Gómez, y que consiste en investigar aspectos importantes sobre el comportamiento del estroma prostático (tejido estructural) en diferentes entidades que afectan a la glándula prostática. Existe la sospecha de que usted puede ser diagnosticado de un proceso prostático y se le ha facilitado información sobre el procedimiento que se le va a realizar y habrá tenido que firmar un consentimiento informado. Ahora, mediante este Documento nosotros le informamos acerca de la naturaleza y objetivos de la investigación que pretendemos llevar a cabo con las muestras de su próstata si usted finalmente nos lo autoriza mediante la firma de este Documento.

#### **DESTINO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO OBTENIDAS EN LA BIOPSIA**

Los tejidos que se extirpan son analizados de rutina en el Servicio de Anatomía Patológica de cara a obtener información adicional del tumor que oriente hacia la conveniencia y/o tipo de tratamiento complementario a la cirugía. Para esos análisis se utiliza una parte de los tejidos obtenidos y la parte restante se elimina o se almacena en el mismo laboratorio.

#### **NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN**

Lo que le solicitamos es utilizar esta otra parte de tejidos restante para realizar en ella investigaciones que nos ayuden a comprender el papel que desempeñan los fibroblastos que están inmersos entre las células de la glándula prostática. Los tumores humanos y otras patologías como la hiperplasia benigna (HPB) no solo están compuestos de células anómalas epiteliales, sino también de otros tipos de células aparentemente normales del organismo, tales como fibroblastos, células de los vasos sanguíneos o células inflamatorias. Investigaciones recientes de nuestro Grupo de investigación, y publicadas recientemente en revistas científicas internacionales, demuestran que los cambios que se producen en los estos fibroblastos pueden explicar parte de la progresión del tumor prostático y de la HPB, lo que puede constituir una base sólida para el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos contra dianas específicas situadas en el estroma tumoral, y permitir no solo tratar si no probablemente prevenir el desarrollo de estas alteraciones en fases curables de la enfermedad.

Clásicamente, el abordaje del estudio oncológico se ha centrado en exclusiva en las células propiamente tumorales, pero esta nueva estrategia derivada de estudios experimentales previos no tiene una traslación a la práctica clínica. Ahora lo que pretendemos en esta investigación es caracterizar los fibroblastos y analizar con detalle sus características propias y su capacidad de influir sobre el crecimiento de células de la HPB o del cáncer de próstata que tienen algunas características comunes, pero también diferenciales, analizando las proteínas relacionadas con esas células.

#### **CONFIDENCIALIDAD**

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos de las pacientes incluidas en el estudio, solo tendrán acceso a los mismos el investigador y su equipo de colaboradores, así como las autoridades sanitarias y/o miembros del Comité Ético de investigación Clínica. El tratamiento de los datos de carácter personal requeridos en este estudio se tratará de acuerdo con la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de los datos personales, y a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y su normativa de desarrollo, entre la que se encuentra el Real Decreto 994/1999, de 11 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contengan datos de ese carácter.

#### **COSTES/COMPENSACIÓN**

**Ninguno** de estos procedimientos supondrá un coste o molestia adicional a lo ya mencionado.

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR ESTE ESTUDIO

Usted no tiene ninguna obligación de participar en este estudio. Su médico le proporcionará los mismos cuidados y atención que proporciona a todos los pacientes independientemente de que estén o no incluidos en este estudio. Igualmente, usted puede abandonar el estudio en todo momento sin tener que dar ninguna explicación, pudiendo exigir la destrucción de todas sus muestras y datos personales.

*No deje de preguntar al profesional que le entregó este documento cualquier duda que le pueda haber surgido.*

*Gracias por haberse planteado su participación y por el tiempo dedicado a leer esta información.*

**AUTORIZACIÓN DEL PACIENTE**

Declaro que **he sido informada** por el médico, de la naturaleza de la investigación que se pretende realizar con una muestra de mi tumor. Asimismo, **doy mi consentimiento** para que el material sobrante de los tejidos extraídos en la intervención quirúrgica y que se utilizarán para el diagnóstico anatomopatológico, en vez de ser destruido, pueda ser utilizado para la investigación que se indica en este documento.

Firma del paciente

Firma del médico

Nombre del representante legal en caso de incapacidad del paciente con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, hijo/a, tutor, etc.) .....

Firma .....D.N.I. ....

Testigos:

Nombre .....D.N.I. ....

Firma del médico

