

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo

**Características diferenciales del estroma prostático normal, hiperplásico, de tumores localizados, metastásicos, sensibles y resistentes a la castración estudiado mediante cultivos celulares de fibroblastos.**

TESIS DOCTORAL

**Cristina González Ruiz de León**

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo

**Características diferenciales del estroma prostático normal, hiperplásico, de tumores localizados, metastásicos, sensibles y resistentes a la castración estudiado mediante cultivos celulares de fibroblastos.**

TESIS DOCTORAL

**Cristina González Ruiz de León**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DEL ESTROMA PROSTÁTICO NORMAL, HIPERPLÁSICO, DE TUMORES LOCALIZADOS, METASTÁSICOS, SENSIBLES Y RESISTENTES A LA CASTRACIÓN ESTUDIADO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES DE FIBROBLASTOS	Inglés: DIFFERENTIAL CHARACTERISTICS OF THE PROSTATIC NORMAL STROMAL CELLS, HYPERPLASIC, CELLS OF LOCALIZED, METASTATIC, SENSITIVE AND CASTRATION RESISTANT TUMORS STUDIED BY CELLS CULTURES OF FIBROBLASTS
2.- Autor	
Nombre: CRISTINA GONZÁLEZ RUIZ DE LEÓN	DNI/Pasaporte/NIE: !
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO	

### RESUMEN (en español)

#### INTRODUCCIÓN:

El cáncer de próstata (CaP) y la hiperplasia benigna de próstata (HBP) son patologías muy prevalentes y con gran repercusión socio-sanitaria. En un contexto histológico, la próstata está constituida por epitelio y estroma. Este último, que es el soporte estructural, cuenta con células que secretan multitud de factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento del epitelio. La interacción entre ambos es muy importante, estando además el estroma implicado en el desarrollo de las dos patologías, mediante mecanismos aún no del todo conocidos. En los últimos años, se han determinado algunos factores diferenciales que estarían sobreexpresados en presencia del estroma reactivo tumoral e inflamatorio. Este es el objetivo de este trabajo, continuar estudiando la expresión de determinados factores en el estroma prostático de tejido normal, HBP y CaP en diferentes estadios con el fin de encontrar posibles marcadores diagnósticos y dianas terapéuticas.

#### MATERIAL Y MÉTODOS:

Tras obtener muestras prostáticas de pacientes con HBP y CaP, se llevó a cabo un cultivo celular de fibroblastos. Una vez aislados, se evaluó en ellos la expresión de 20 factores derivados del estroma entre los que se incluyeron el receptor androgénico (RA), factores de crecimiento (FGF7, FGF10, NUDT6, HGF, TGFB y PDGF $\beta$ ), proteínas implicadas en la invasión (MMP-2, MMP-9 y MMP-11), inflamación (IL-6, IL-17RB, STAT3 y NFk $\beta$ ), chaperonas (HSF1 y HPA1A) y proteínas implicadas en la interacción epitelio/estroma (CDH11, FAP, CXCL12 y CXCL14). Por último, realizamos estudios



estadísticos para evaluar la diferencia de expresión de los mismos por los distintos grupos empleando pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney, de Kruskal-Wallis y correlación de Spearman).

### **RESULTADOS:**

Se analizaron 88 muestras de 50 pacientes; 7 con HBP y 43 con CaP en diferentes estadios y fases de la enfermedad. De estos últimos se obtuvieron muestras periféricas al tumor como grupo control de tejido normal. Encontramos diferencias en la expresión de algunos de estos factores, en función de los grupos estudiados. Existe un conjunto de factores que se diferencia en la expresión génica entre los fibroblastos de tejido normal (NAF) y el resto de grupos; FGF7, MMP-2, MMP-9 e IL-6 aparecen elevados tanto en los fibroblastos de HBP como en los fibroblastos asociados a CaP (CAF) en sus diferentes estadios. Por el contrario, FGF10, MMP-11 e IL-17RB se expresan en menor cantidad en los fibroblastos de HBP y en los CAF en comparación con los NAF. Los fibroblastos de HBP se diferencian de los CAF de CaP localizado (CPL) en un aumento en la expresión génica de PDGF y CXCL14 y una disminución en la expresión de FAP. En los CAF de CaP metastásico (CPM+) aparece una disminución de la expresión de IL-6 con respecto a los CAF de CPL. Los CAF de pacientes con TDA presentan un aumento en la expresión de RA, HSF-1 y HSPA1A con respecto a los NAF y a los CAF de CPL. Sin embargo, la expresión de HGF, FAP y CDH11 por los CAF de pacientes con TDA, es menor que en los NAF y los CAF de CPL. Los CAF de los pacientes con TDA presentan un aumento de IL-6 respecto a CPM+ y una disminución en la expresión de HGF. Por último, la expresión génica de MMP-11, HSPA1A y NF $\kappa$ B está aumentada en los CAF de CaP resistente a la castración (CPRC) con respecto a los de CaP sensible a castración (CPSC) mientras que la expresión de TGF $\beta$ -1 es menor en CPRC.

### **CONCLUSIONES:**

Estos resultados nos permiten establecer posibles marcadores diagnósticos como PDGF $\beta$  y CXCL14 para HBP y pronósticos como MMP-11 y HSF1 en CaP. Igualmente hemos encontrado diferencias que permiten estudiar posibles dianas terapéuticas con una probable aplicabilidad clínica futura, como anticuerpos monoclonales anti IL-6 y su receptor o anti CDH11, profármacos dirigidos contra FAP o HSPA1A como diana terapéutica en fase de CPRC. Aunque para todo ello se precisan más estudios que consigan validar externamente nuestros resultados con mayor número de pacientes.



## RESUMEN (en Inglés)

### INTRODUCTION:

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are very prevalent pathologies with a great socio-economic impact. Histologically, the prostate is made of epithelial tissue and stroma. The latter, which constitute the structural support, is made of growth factor-releasing cells, needed to maintain the epithelium. The interaction between these two components is extremely important, being the stroma the one that is involved with the development of both PCa and BPH pathologies. However, the underlying mechanisms are not quite known. In the last years, some differential factors have been identified, and it has been shown that they are overexpressed in the presence of tumoral and inflammatory reactive stroma.

The aim of this study is to continue studying the expression of certain stromal factors in healthy tissue of the prostate, BPH and in different stages of PCa, in order to find some possible diagnostic markers and therapeutic target agents.

### MATERIAL AND METHODS:

After obtaining prostate samples from patients with BPH y PCa, a fibroblast cell culture was made. Once they were isolated, the expression of 20 stromal-derived factors were evaluated including androgenic receptor (AR), growth factors (FGF7, FGF10, NUDT6, HGF, TGFB1 and PDGF $\beta$ ), invasion-involved proteins (MMP-2, MMP-9 and MMP-11), inflammation markers (IL-6, IL-17RB, STAT3 and NFk $\beta$ ), chaperones (HSF-1 and HPA1A) and proteins implicated in stromal/epithelial interaction (CDH11, FAP, CXCL12 and CXCL14). Lastly, we made statistical analyses to evaluate differences of expression of these factors among distinct groups using non-parametric tests (U Mann Withney, kruskal-Wallis and Spearman correlation).

### RESULTS:

Eighty-eight samples of 50 patients were analyzed; 7 BPH and 43 PCa patients at different stages of the disease. We also obtained samples from the periphery of the tumor of these patients, as a control group of healthy tissue. We found statistical differences in the expression of some of these factors, among the different groups of patients. There is a set of factors that differ in gene expression between non-tumor fibroblasts (NAF) and the remaining groups; FGF7, MMP-2, MMP-9 and IL-6 are elevated in both BPH fibroblasts and in those associated to cancer (CAFs), also in the



different stages of the disease. In contrast, FGF10, MMP-11 and IL-17RB are less expressed in BPH fibroblasts and in CAFs compared to the NAF. Fibroblasts from BPH differ from localized prostate cancer (LPC) CAFs in an increased gene expression of PDGF and CXCL14 and a decreased FAP expression. In metastatic PCa (M+PC) CAFs, there is a lower expression of IL-6 related to LPC CAFs. CAFs from patients with ADT have a higher level of IL-6 compared to M+CP, and a lower expression of HGF. Finally, MMP-11, HSPA1A and NF $\kappa$ B gene expression is increased in castration resistant PCa (CRPC) CAFs with regard to castration-sensitive PCa (SCPC), whereas TGF $\beta$ -1 expression is lower in CPRC.

### **CONCLUSIONS:**

These results allow us to establish some possible diagnostic markers as PDGFb and CXCL14 for BPH and prognostic markers as MMP-11 and HSF1 in CaP. Equally, we have found some differences that enable us to study some possible target agents with a probably future clinical applicability, such as anti-IL-6 monoclonal antibodies or its receptor or anti-CDH11 monoclonal antibodies, pro-drugs guided against FAP or HSPA1A as a target therapy in CRPC stage. Nevertheless, more studies are needed for an external validation of our results, with a higher sample size.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**  
EN \_\_\_\_\_

# Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que han colaborado en esta tesis doctoral, en especial a mi director, el Dr. **Jesús M. Fernández** por todas las facilidades que me ha dado para llevar a cabo el trabajo, la ayuda y la paciencia que ha mostrado frente a todos los cambios realizados.

A mi otro director el **Dr. Francisco Vizoso** por las ayudas y aportaciones de mejora llevadas a cabo durante el desarrollo de la tesis.

A **Jorge**, también de una manera muy especial por aguantarme además de ayudarme con la corrección de temas de redacción y haber participado de manera tan activa aportando ideas de mejora.

A todo el resto de personas que han trabajado en ella como **Noemí Eiró**, por haber realizado los cultivos celulares y todo el esfuerzo dedicado a este trabajo.

A **mi familia**, por todo el apoyo que me han dado durante este tiempo y el ánimo para terminarla, gracias por estar siempre ahí.

No puedo terminar, sin mencionar la ayuda de **Paloma Pellejero**, quien ha sido mi almacén y mi transporte de muestras al hospital de Jove. Por haber recogido parte de las muestras necesarias para este trabajo a través de biopsias de próstata. Gracias Paloma, por esconder esas muestras en tu nevera y aguantar las broncas de Adri.

A todas las personas que participaron en la recogida de muestras empleadas en este trabajo.

# Índice

<b>Índice</b> .....	I
<b>Índice de Tablas</b> .....	VII
<b>Índice de Figuras</b> .....	IX
<b>Abreviaturas</b> .....	XIII
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Desarrollo prostático .....	3
1.1.1 Estroma prostático .....	5
1.1.2 El receptor androgénico: estructura y función .....	8
1.2 Hiperplasia benigna de próstata .....	10
1.2.1 Epidemiología y diagnóstico .....	10
1.2.2 Factores tisulares derivados del estroma .....	12
1.2.2.1 Receptor androgénico .....	12
1.2.2.2 Factores de crecimiento .....	13
1.2.2.3 Proteínas de la invasión: Metaloproteinasas .....	14
1.2.2.4 Inflamación .....	14
1.3 Cáncer de próstata .....	15
1.3.1 Epidemiología y diagnóstico .....	15
1.3.2 Factores tisulares dependientes del estroma .....	21
1.3.2.1 Receptor androgénico .....	22
1.3.2.2 Factores de crecimiento .....	24

1.3.2.3	Proteínas de la invasión: Metaloproteinasas .....	25
1.3.2.4	Inflamación y chaperonas .....	25
1.3.2.5	Interacción epitelio/estroma .....	27
1.4	Estudio de factores moleculares en cultivos celulares .....	28
<b>2.</b>	<b>Hipótesis .....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>Material y métodos .....</b>	<b>39</b>
4.1	Diseño del estudio .....	41
4.2	Población de estudio .....	41
4.3	Métodos de obtención de muestras .....	43
4.4	Tratamientos con intención curativa .....	44
4.5	Selección de las muestras válidas para el estudio .....	45
4.6	Obtención de los datos clínicos .....	46
4.7	Técnica de cultivo de fibroblastos .....	47
4.8	Determinaciones moleculares .....	48
4.9	Aspectos éticos y de confidencialidad .....	50
4.10	Estudio estadístico .....	50
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>51</b>
5.1	Características clínico-patológicas .....	53
5.2	Correlaciones en la expresión génica de los factores en los fibroblastos de diferentes poblaciones .....	61

5.2.1 Correlaciones en la expresión génica de los factores expresados por los NAF .....	61
5.2.2 Correlaciones en la expresión génica de los factores los factores expresados por los CAF .....	64
5.3 Relación de la expresión génica de los CAF y las características clínico-patológicas de los CPL .....	66
5.3.1 Correlaciones de los niveles de expresión génica de los distintos factores por los CAF con PSA.....	66
5.3.2 Comparación de la expresión génica de los factores por los CAF de CPL según estadio .....	67
5.3.3 Expresión génica de factores por los CAF según clasificación ISUP .....	68
5.4 Comparación de la expresión génica de los NAF de tejido sano cercano y lejano al tumor .....	68
5.5 Comparación del perfil génico de los CAF de los tumores principales con los de los focos secundarios en los CaP multifocales .....	68
5.6 Expresión génica de los factores en los NAF en comparación con fibroblastos de HBP y CAF .....	70
5.6.1 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los fibroblastos de HBP .....	70
5.6.2 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de CPL .....	71
5.6.3 Comparación de la expresión génica de factores entre los fibroblastos de HBP y los CAF de CPL .....	73

5.7 Comparación del perfil génico de los NAF y de los CAF de CPL con los de los CPM+ y los de los sometidos a TDA .....	74
5.7.1 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de CPM+ .....	74
5.7.2 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPL y los CAF de CPM+ .....	75
5.7.3 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF, los CAF de CPL y los CAF de CPM+ .....	76
5.7.4 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de pacientes sometidos a TDA .....	76
5.7.5 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPL y los de pacientes sometidos a TDA .....	79
5.7.6 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPM+ y los de pacientes sometidos a TDA .....	80
5.8 Comparación del perfil génico de los CAF de los carcinomas de próstata hormonosen­sibles (CPSC) con los homonorrefractarios (CPRC) .....	81
<b>6. Discusión .....</b>	<b>85</b>
6.1 Estudio del perfil génico de los CAFs de CPL en función de las características clínico-patológicas .....	88
6.1.1 Correlación de la expresión génica de los factores con PSA .....	88
6.1.2 Correlación de la expresión génica de los factores con el estadio tumoral .....	88

6.2 Comparación del perfil génico de los CAFs de los focos tumorales en los casos de multifocalidad .....	89
6.3 Comparación de la expresión génica de los factores por los NAF, los fibroblastos de HBP y los CAF de CPL, CPM+ y pacientes sometidos a TDA90	
6.3.1 Factores de crecimiento .....	90
6.3.2 Metaloproteinasas .....	93
6.3.3 Inflamación .....	96
6.3.4 Factores distintivos de HBP .....	97
6.3.5 Factores distintivos de CPL respecto a HBP .....	98
6.4 Comparación de la expresión génica de los factores por los CAF de CPL, CPM+ y pacientes sometidos a TDA .....	99
6.4.1 Comparación de la expresión génica de los CAF en tumores localizados y metastásicos .....	99
6.4.2 Cambios debidos a TDA .....	100
6.4.3 Comparación de la expresión génica de los NAF con los CAF de pacientes sometidos a TDA .....	103
6.4.4 Comparación de la expresión génica de los CAF de pacientes metastásicos sin tratamiento con aquellos sometidos a TDA .....	103
6.5 Comparación de la expresión génica de los factores por los CAF de CPRC y CPSC .....	104
Limitaciones .....	106
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>107</b>

<b>8. Bibliografía</b> .....	113
<b>9. Anexos</b> .....	129
Anexo 1 .....	131
Anexo 2 .....	135

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Factores que regulan el crecimiento prostático

**Tabla 2.** Factores de crecimiento del estroma

**Tabla 3.** Probabilidad de CaP según PHI

**Tabla 4.** Sistema de gradación PIRADS v2

**Tabla 5.** Calsificación ISUP 2014

**Tabla 6.** Tabla de factores estromales analizados en el estudio

**Tabla 7.** Distribución de la edad media de los pacientes por tipo de patología

**Tabla 8.** Mediana del volumen prostático por grupos

**Tabla 9.** Suma de Gleason de biopsia prostática por grupos de pacientes con CaP.

**Tabla 10.** Correlación de la suma de Gleason entre biopsia de próstata y pieza de prostatectomía radical.

**Tabla 11.** Grupo ISUP

**Tabla 12.** Estadio en tumores localizados

**Tabla 13.** Correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión génica de los diferentes factores por los NAF

**Tabla 14.** Correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión génica de los diferentes factores por los NAF II.

**Tabla 15.** Correlación de Spearman entre factores expresados por los CAF.

**Tabla 16.** Diferencias en la expresión de los factores estromales entre los fibroblastos de los distintos grupos de muestras.

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Interacciones entre los componentes epitelial y estromal/mesenquimal de la próstata durante el desarrollo y en el adulto

**Figura 2.** Estructura celular prostática normal

**Figura 3.** Alteraciones epiteliales y estromales en la carcinogénesis

**Figura 4.** Estructura del receptor androgénico

**Figura 5.** Tasas de incidencia y mortalidad estimadas estandarizadas por edad por 100.000 varones, GLOBOCAN 2012

**Figura 6.** Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en varones en España en el año 2015 (REDECAN)

**Figura 7.** Diagrama de decisiones con herramientas disponibles para el diagnóstico de CaP

**Figura 8.** Esquema de biopsia de próstata

**Figura 9.** Imágenes representativas de cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento

**Figura 10.** Distribución de los pacientes por tipo de caso

**Figura 11.** Valores de PSA según tipo de patología

**Figura 12.** Valores de PSA por tipo de patología

**Figura 13.** Suma de Gleason de biopsia prostática por grupos de pacientes con CaP

**Figura 14.** Pacientes agrupados por ISUP para análisis estadísticos

**Figura 15.** Coeficiente de correlación de Spearman entre la expresión génica de los factores por parte de los CAF y los niveles de PSA

**Figura 16.** Boxplot de la expresión génica de los factores estromales expresados por los CAF en función del estadio

**Figura 17.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en el tumor principal en relación con el tumor secundario

Figura 18. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en tumor secundario en relación con el tumor principal

**Figura 19.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en HBP respecto a los NAF

**Figura 20.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en HBP respecto a los NAF

**Figura 21.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de CPL respecto a los NAF

**Figura 22.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de CPL respecto a los NAF

**Figura 23.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores en los fibroblastos de HBP respecto a los CAF de CPL.

**Figura 24.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de CPM+ respecto a los NAF

**Figura 25.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de CPM+ respecto a los NAF

**Figura 26.** Boxplot comparando la mediana de expresión de IL-6 entre los CAF de CPL y CPM+

**Figura 27.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores entre los NAF, los CAF de CPL y los CAF de CPM+

**Figura 28.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentada en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los NAF

**Figura 29.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuida en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los NAF

**Figura 30.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de pacientes sometidos a TDA respecto a los CAF de CPL

**Figura 31.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los CAF de CPL

**Figura 32.** Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores en los CAF de CPM+ con respecto a los CAF de pacientes sometidos a TDA

**Figura 33.** Boxplot comparando la mediana de expresión génica de los factores expresados por los CAF de CPSC y los CAF de CPRC

**Figura 34.** Boxplot representando la expresión génica de FGF7 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 35.** Boxplot representando la expresión génica de FGF10 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 36.** Boxplot representando la expresión génica de MMP-2 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 37.** Boxplot representando la expresión génica de MMP-9 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 38.** Boxplot representando la expresión génica de MMP-11 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 39.** Boxplot representando la expresión génica de IL-6 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

**Figura 40.** Boxplot representando la expresión génica de IL-17RB estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados

## Abreviaturas

5ARI	Inhibidores de la 5 alfa reductasa
AF	Función de activación
AR-FL	Receptor androgénico de longitud completa
ARV	Variantes splice
AUC	Área bajo la curva
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer de próstata
CaP	Cáncer de próstata
CCS	Cáncer clínicamente significativo
CDH11	Cadherina 11
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
CXCL12	Factor derivado de célula estromal-1
CXCL14	C-X-C Ligando de quimiquina 14
DBD	Dominio de unión al ADN
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
Ds	Desviación estándar
EEUU	Estados Unidos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
FAP	Proteína alfa de activación de los fibroblastos
FC	Factores de crecimiento
FDA	Food and Drug administration

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGF10	Factor de crecimiento de fibroblastos 10
FGF7	Factor de crecimiento de fibroblastos 7
fPSA	PSA libre
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HGF	Factor de crecimiento hepatocítico
HSF-1	Factor de transcripción de choque térmico 1
HSPA1A	Proteínas De Shock Térmico De 70 Kda
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL-17	Interleuquina 17
IL-17RB	Receptor de la interleuquina 17
IL-6	Interleuquina 6
IPDE-5	Inhibidor de la 5-fosfodiesterasa
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LBD	Dominio de unión al ligando
Máx	Máximo
MEC	Matriz extracelular
Min	Mínimo
MMP-11	Metaloproteinasa 11
MMP-2	Metaloproteinasa 2
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MMPs	Metaloproteinasas
NAF	Fibroblastos de tejido normal
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NFk $\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NTD	Dominio de transactivación N-terminal
NUDT6	Nudix hidrolasa-6
PCA3	Prostate Cancer Gen 3
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF $\beta$	Factor de crecimiento derivado de plaquetas $\beta$
PHI	Índice de salud prostática

PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PIRADS	Prostate Imaging – Reporting and Data System.
pN	Afectación ganglionar
PR	Prostatectomía radical
PRL	Prolactina
PSA	Antígeno prostático específico
PSAd	Densidad de PSA
pT	Estadio patológico
RA	Receptor androgénico
RECIST	Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores sólidos
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RMmp	Resonancia Magnética multiparamétrica
RT	Radioterapia
RTUp	Resección transuretral de próstata
SFB	Suero fetal bobino
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
T1	Fibroblastos de tejido tumoral 1
T2	Fibroblastos de tejido tumoral 2
TAU	Unidad de transactivación
TDA	Terapia de deprivación androgénica
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF $\alpha$	Factor de crecimiento transformante $\alpha$
TIMP-1	Tissue Inhibitor of MMPs-1
tPSA	PSA total
TSE	Tasas estandarizadas por edad
UTR	Región no traducida
VEGF	Factor de crecimiento vasculo-endotelial
VPN	Valor predictivo negativo



## *1.Introducción*

---



## 1.1 DESARROLLO PROSTÁTICO

Durante el tercer mes de desarrollo embrionario, el seno urogenital, ya dividido en epitelial y mesenquimal, comienza la transformación que finalmente conformará la glándula prostática (1). Para que este proceso se lleve a cabo, es indispensable que se produzcan interacciones entre ambos componentes, además de la influencia de los andrógenos, principalmente la dehidroepiandrosterona (DHEA).

La zona más interna de la glándula tendrá un origen mesodérmico mientras que la parte más externa se formará a partir del endodermo. Esto tiene su importancia a la hora de entender el desarrollo de las diferentes patologías prostáticas, puesto que la derivada del mesodermo dará lugar a la hiperplasia benigna de próstata (HBP), mientras que la zona externa será donde se origine habitualmente el cáncer de próstata (CaP).

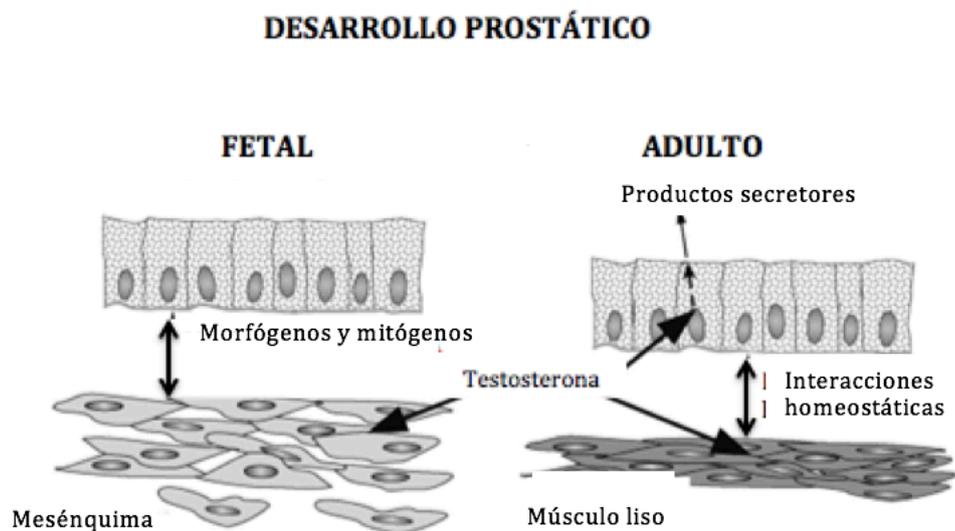


Figura 1. Interacciones entre los componentes epitelial y estromal/mesenquimal de la próstata durante el desarrollo y en el adulto (2).

En las primeras fases del desarrollo de la glándula, el crecimiento epitelial depende de los andrógenos a través del receptor androgénico (RA) (3), más presente en el estroma y casi indetectable en el epitelio. Se cree, por tanto, que las primeras fases están reguladas por el componente mesenquimal/estromal induciendo la diferenciación epitelial, la formación de glándulas y su función secretora (2, 4, 5). De manera recíproca, el epitelio inducirá la diferenciación del mesénquima en músculo liso. Sin embargo, en la fase postpuberal, el RA epitelial será el principal responsable de la expresión de proteínas secretoras dependientes de RA (6), situado en las células luminales.

En la fase final del desarrollo la próstata está compuesta ya por epitelio y estroma. El epitelio contiene células madre, células basales, células luminales, células neuroendocrinas y células amplificadoras de señales. El estroma sirve como soporte estructural y está compuesto principalmente por tejido conectivo, células de músculo liso y fibroblastos intersticiales y subepiteliales. Las células madre epiteliales, fundamentales en el soporte de todo el componente epitelial, precisan para su mantenimiento un ambiente rico en factores de crecimiento (FC) secretados por las células del estroma. Es decir, la interacción entre ambos componentes es básica para el desarrollo de la glándula.

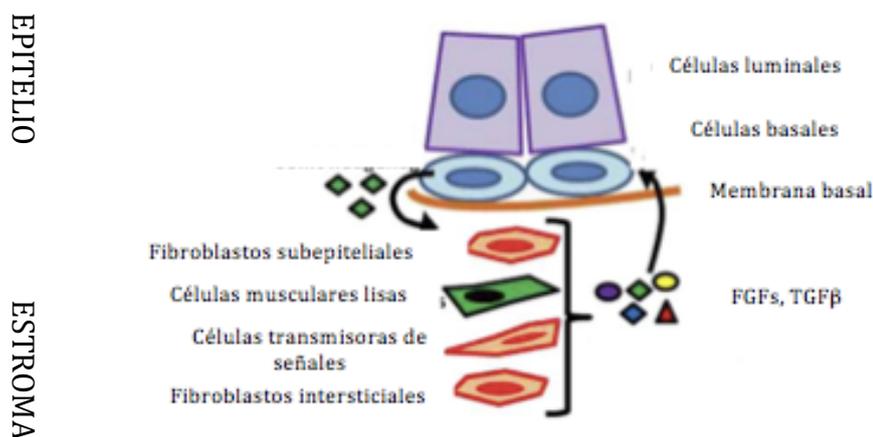


Figura 2. Estructura celular prostática normal (7).

En este proceso de desarrollo prostático normal, así como en el de las patologías prostáticas hay dos componentes muy involucrados, que desempeñan un importante papel; el estroma y el receptor androgénico.

### 1.1.1 Estroma prostático

El estroma está básicamente formado por células musculares lisas que regulan el crecimiento prostático benigno en condiciones normales. Sin embargo, los fibroblastos son las células estromales más importantes. Son los responsables de la síntesis y el depósito de los componentes de la matriz extracelular, permitiendo a otras células asentarse o migrar creando arquitecturas órgano-específicas. Los fibroblastos participan en procesos fisiológicos como en la angiogénesis o reparación tisular (8), pero además participan en procesos patológicos como HBP y CaP, ya que el estroma puede tener un efecto “instructivo”, “permisivo” o “reactivo” sobre el epitelio. Así, las células mesenquimales embrionarias pueden instruir a las células epiteliales para formar glándulas. Este desarrollo del epitelio, a su vez, inducirá la diferenciación de las células estromales musculares lisas (9). Si no existe un suministro continuo de andrógenos que mantenga esta cadena de interacciones, la próstata comienza a regresar, especialmente las células lumbales con RA (10).

**Tabla 1. Factores que regulan el crecimiento prostático.** FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos; EGF: factor de crecimiento epidérmico.

<b>Factores endocrinos</b>	Andrógenos, estrógenos, prolactina, insulina, etc.
<b>Señales neuroendocrinas</b>	Serotonina, norepinefrina.
<b>Factores paracrinos</b>	FGF, EGF.
<b>Factores autocrinos</b>	Factor de motilidad autocrino
<b>Factores matriz extracelular</b>	Establecen contacto directo con la membrana basal a través de integrinas y glicosaminoglicanos

Se ha postulado que los FC secretados por las células epiteliales están bajo el control de algún factor producido por los fibroblastos (11). Los andrógenos y estrógenos, a través de sus receptores que se sitúan tanto en las células del epitelio como del estroma, también participan en esta regulación. Así los FC dirigen la proliferación y diferenciación de éste último (12). Esto pone en evidencia la importancia de las comunicaciones intercelulares mediadas por las “gap junction” en el desarrollo tisular (13).

En el adulto, el crecimiento se mantiene en estado quiescente mediante interacciones epitelio-estroma. En condiciones normales, existe un equilibrio entre los factores que inducen la producción de la matriz extracelular, suprimen la degradación de colágeno y la proliferación celular, tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ -1) y factores que ejercen acción mitógena en el compartimento estromal, como el factor de crecimiento de fibroblastos dos (FGF2) y el factor de crecimiento insulínico (IGF) I-II. Existe, por tanto, un balance entre factores promotores e inhibidores de crecimiento que mantiene el desarrollo normal de la glándula. Cuando por algún motivo desaparece este equilibrio, surgen las distintas patologías prostáticas.

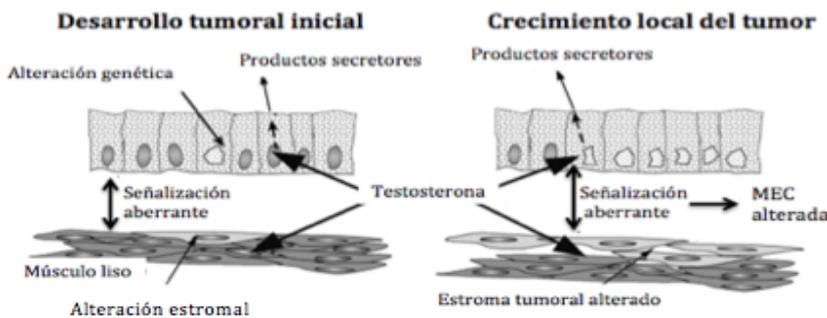
**Tabla 2. Factores de crecimiento del estroma.** EGF: Factor de crecimiento epidérmico; TGF $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante  $\alpha$ .; FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos; KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos; TGF $\beta$  1-3: Factor de crecimiento transformante isoformas 1-3.

<b>EGF, TGF-<math>\alpha</math></b>	Mayor expresión en fase de desarrollo
<b>FGF</b>	Aumento de proliferación o inhibición de apoptosis.
<b>FGF2</b>	Altas concentraciones en áreas periféricas. Sólo una pequeña fracción es extracelular ya que se excreta en baja cuantía.
<b>FGF7</b>	Niveles correlacionados con la velocidad de proliferación epitelial.
<b>FGF9</b>	Papel fundamental en el desarrollo prostático.
<b>FGF17</b>	Expresado en células epiteliales normales, hiperplásicas y neoplásicas. Promueve la proliferación epitelial.
<b>KGF</b>	Producido y secretado por fibroblastos con acción paracrina sobre las células epiteliales.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Modulador de crecimiento y funciones celulares, principalmente inhibidor. Estimula la síntesis de matriz extracelular y la expresión de integrinas, suprime funciones linfocitarias, regula angiogénesis etc.
<b>TGF<math>\beta</math>-1</b>	Inductor de apoptosis en células epiteliales e inhibidor en estromales.
<b>TGF<math>\beta</math>-2</b>	Niveles disminuidos en HBP. Inhibidor del crecimiento epitelial y estimulador del crecimiento de la célula estromal. Densidad de TGF $\beta$ -2 (TGF $\beta$ -2/vol. Prostático) disminuida en pacientes con HBP.
<b>IGF I Y II</b>	Factores mitógenos de las células estromales. Receptor aumentado en HBP, induciendo mayor proliferación del estroma.

Los componentes del estroma se ven afectados por la edad. Las células inflamatorias y los miofibroblastos se vuelven más abundantes, los fibroblastos se vuelven senescentes, siendo menos dependientes de los andrógenos (14) y la expresión génica del estroma cambia (15).

Asimismo, esta expresión génica varía según la localización dentro de la próstata (16), razón por la cual los tumores se asientan a nivel periférico (17) y la HBP en la zona transicional. Las células estromales de la zona periférica normal, con HBP y con CaP, tienen efectos diferentes sobre las células epiteliales. Así, por ejemplo, las células estromales de la zona periférica normal no tienen la capacidad de inducir crecimiento, mientras que las de HBP generan tejido de arquitectura normal. Por otro lado, en el estroma tumoral, las células serán fundamentalmente fibroblastos (18), denominados fibroblastos asociados a CaP o “cancer associated fibroblasts” (CAF) que, asociados a las células epiteliales, promueven la carcinogénesis de las células de HBP (19), generando tejido a gran velocidad y con aspecto más agresivo (20).

El hecho de que el estroma juega un papel en la carcinogénesis no solo ha sido estudiado en el CaP, también en otros tumores. Una vez que se ha desarrollado el carcinoma, las células epiteliales malignas continúan respondiendo a las influencias del estroma pudiendo así promover o inhibir la progresión del tumor (21). Se han publicado trabajos que correlacionan (22) la carcinogénesis con anomalías en ambos componentes, epitelio y estroma. Sin embargo, si sólo el epitelio está alterado, tendrá lugar una hiperplasia epitelial, mientras que si el componente alterado es únicamente el estroma, se producirá una desmoplasia estromal.



**Figura 3. Alteraciones epiteliales y estromales en la carcinogénesis . MEC: Matriz extracelular.**

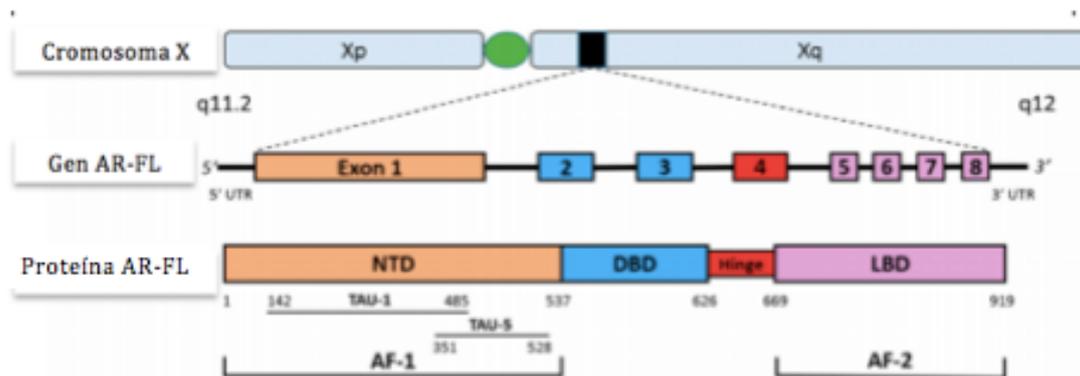
Durante años, los estudios se han focalizado en el estudio de las células tumorales de CaP, pero con el tiempo se ha determinado la importancia de otros componentes para el desarrollo tumoral, crecimiento y metástasis (23). Mediante factores de crecimiento, los CAF inducen la proliferación maligna de las células epiteliales adyacentes (24), que se conoce como estroma reactivo. Además, en todo este proceso participan múltiples factores solubles coordinados con otras moléculas de señalización como las hormonas esteroideas y sus receptores. Estas interacciones pueden desencadenar y facilitar la carcinogénesis, el crecimiento del tumor local y las metástasis a distancia (25).

Por otro lado, sabemos que el estroma también juega un papel importante en el desarrollo de la HBP. De hecho, la primera manifestación es la aparición de mesénquima en nódulos periuretrales. Este mesénquima tiene una apariencia similar al de la próstata durante el desarrollo (26) que posteriormente da lugar al estroma. En fases más avanzadas, brotes glandulares y ramificaciones avanzan hacia un foco central que va favoreciendo el crecimiento de los nódulos. Esta evidencia morfológica sugiere que esta patología es intrínseca del mesénquima/estroma que surge por la reactivación de interacciones inductivas embrionarias entre el estroma y el epitelio prostático. Las células estromales de HBP y los CAF tienen capacidad de inducir el crecimiento de las células epiteliales pero de diferente manera, como ya se ha comentado previamente (20). Mientras que en HBP el tejido es similar al normal, los CAF producirán un tejido más abigarrado y agresivo.

### **1.1.2 El receptor androgénico: estructura y función**

Como se ha descrito previamente, la función del RA va variando a lo largo del desarrollo prostático. El gen del RA se encuentra en el cromosoma Xq11-12, está compuesto por 8 exones y codifica una proteína multidominio, miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas. Su función principal es comportarse como un factor de transcripción de unión a ADN activado por andrógenos, regulando expresiones génicas específicas. Se trata de una proteína constituida por 919 aminoácidos con 4 dominios funcionales:

- Dominio de transactivación N-terminal (NTD): Es constitutivamente activo y se encarga de la activación transcripcional, siendo especialmente importante para interactuar con el complejo de transcripción celular.
- Dominio de unión al ADN (DBD): Formado por dos dominios que coordinan la unión del RA a secuencias de ADN específicas.
- Dominio de unión al ligando (LBD): Facilita la unión de ligandos androgénicos que actúan como mecanismo de control primario del eje de señalización del RA.
- Región bisagra: Separa el DBD del LBD y contiene la señal de traslocación nuclear, necesaria para la importación nuclear del RA (27).



**Figura 4. Estructura del receptor androgénico (28).** AF: Función de activación; AR-FL: Receptor androgénico de longitud completa; DBD: Dominio de unión a ADN; LBD: Dominio de unión a ligando; NTD: Dominio de transactivación N-terminal; TAU: Unidad de transactivación; UTR: Región no traducida (27).

El receptor permanece inactivo en el citoplasma, donde se une a las chaperonas. En ausencia de activación por dihidrotestosterona (DHT), una señal de exportación nuclear ayuda a mantenerlo en el citoplasma (29). Sin embargo, tras la unión de DHT al dominio LBD, el RA se activa y se suprime la señal de exportación nuclear. Se disocia de las chaperonas, se homodimeriza y es traslocado al núcleo donde se une a los elementos de respuesta androgénica. Esto regula la transcripción de genes que provocan acciones como el crecimiento prostático y la progresión del CaP. La transcripción del Antígeno Prostático Específico (PSA) está

regulada por el RA por lo que sus niveles séricos se podrían considerar como un marcador de la actividad del RA en la célula tumoral.

## **1.2 HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA**

### **1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO**

La HBP se trata de la alteración no maligna prostática más frecuente en varones aumentando su prevalencia con la edad. Aunque no es la única causa de síntomas de tracto urinario inferior, sí es uno de los principales factores implicados (30). Afectará a la calidad de vida de más de un cuarto de hombres por encima de los 40 años (30). Así, estudios clásicos han mostrado que un varón de 60 años tiene una probabilidad del 25% de padecer una retención urinaria a lo largo de su vida (31) y casi un tercio requerirá una intervención quirúrgica relacionada con HBP (32).

Esta hiperplasia es una condición progresiva que suele producir un aumento del volumen prostático de 1-2 cc al año (33) con una disminución media del pico de flujo urinario de 0,2 ml/sg/año, siendo con frecuencia las próstatas de mayor volumen las que se asocian a síntomas obstructivos más severos y progresivos (34). La repercusión socio-sanitaria de esta entidad y los costes que suponen son importantes, llegando en Estados Unidos (EEUU) a estimarse que alcanzan los 4 billones de dólares anuales, con un incremento constante debido al envejecimiento de la población (35).

Prácticamente la totalidad de las lesiones hiperplásicas se producirán en la zona transicional de la próstata, estando constituidas principalmente por estroma (> 80%). Por un proceso de regresión embriológica mesenquimal, se forman nódulos estromales, que inducen la formación de nuevas glándulas perpetuando así el proceso, tal y como fue definido por McNeal en 1990 (36). Realmente, la etiología de la HBP se desconoce, pero es posible que las señales andrógeno-RA en el estroma puedan influir en el inicio y la progresión, a través de la secreción auto y/o paracrina (37) de diversos factores. Estos estarían implicados en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) así como en la inflamación que está presente en la

histología de los nódulos hiperplásicos (37). Se ha descrito que los estrógenos, en sinergia con los andrógenos, son capaces de estimular el estroma prostático aumentando el número de receptores androgénicos y favoreciendo así la producción de DHT a la vez que alteran la apoptosis (38).

Los andrógenos serán fundamentales para el desarrollo de esta patología, ya que no se presenta en individuos castrados o antes de un completo desarrollo de la próstata en la pubertad (39). Parece también, que la prolactina (PRL) podría tener un papel en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de la próstata de manera independiente a los andrógenos (40). En los hombres, los niveles séricos de PRL aumentan con la edad, indicando que su “rol” en el desarrollo de la HBP es más importante con el paso de los años (41). Se ha sugerido que la PRL induce el aumento del número de receptores de andrógenos y promueve el crecimiento y proliferación de las células prostáticas en sinergismo con los andrógenos (42).

Desde hace años, en la mayoría de guías urológicas, se ha establecido para pacientes con HBP y síntomas obstructivos o irritativos leves o moderados, un abordaje mediante tratamiento farmacológico (43, 44). Sin embargo, cuando existe una clínica muy severa o progresión de la enfermedad causando retención o infecciones urinarias estaría indicada la cirugía (43) (45). Los antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos son empleados frecuentemente en el tratamiento. Reducen el tono del cuello vesical, siendo efectivos en caso de síntomas obstructivos moderados a severos aunque no se ha logrado demostrar urodinámicamente una disminución de la resistencia, por lo que probablemente existan otros mecanismos relacionados y no bien establecidos (46).

Los andrógenos y el receptor androgénico, tanto a nivel epitelial como estromal juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta patología (47). En este sentido, otro de los tratamientos más empleados interfiere en el paso de testosterona a DHT inhibiendo el enzima 5- $\alpha$ -reductasa, sobre todo la de tipo 2, de localización principalmente prostática. Estos logran disminuir el tamaño prostático un 20-30%, mejoran el flujo urinario y reducen el riesgo de retención urinaria,

sobre todo cuando se emplean en casos de mayor volumen, factor asociado a mayor riesgo de progresión de la obstrucción.

Se utilizan otros tratamientos como antimuscarínicos y, recientemente, tadalafilo, un inhibidor de la 5-fosfodiesterasa (IPDE-5). Este último produce un incremento en el Guanosín monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, reduciendo el tono del músculo liso del detrusor, próstata y uretra (48).

En cualquier caso, hasta este momento no se ha establecido ningún tratamiento etiológico debido, fundamentalmente, al desconocimiento de los mecanismos moleculares de desarrollo y progresión de la HBP. Muchos de estos aparentemente podrían ser comunes a los del CaP en áreas diferentes de la glándula.

### **1.2.2 FACTORES TISULARES DERIVADOS DEL ESTROMA**

En la hiperplasia de la zona transicional se entremezclan factores dependientes de andrógenos, con otros no dependientes más relacionados con la inflamación, fundamentalmente con la infiltración por células T en el estroma de la glándula, que secretan diversas citoquinas que finalmente favorecerán la proliferación estromal (49). La expresión aumentada de determinados de estos factores, colaborará en el desarrollo de la HBP.

Algunos de los factores estromales más importantes y en los que se ha visto relación con el desarrollo o progresión de HBP, se describen a continuación.

#### **1.2.2.1 Receptor androgénico**

Como ya se ha comentado, los andrógenos son fundamentales para el desarrollo de HBP, y por tanto el RA, al que nos hemos referido en un apartado anterior. Por ello, uno de los tratamientos de la HBP son los inhibidores de la 5 alfa reductasa (5ARI), responsables de la conversión de testosterona en 5 alfa-dihidrotestosterona, principal andrógeno que ocasiona el crecimiento de la próstata.

### 1.2.2.2 Factores de crecimiento

Como también se ha expresado anteriormente, epitelio y estroma tienen una estrecha relación de señalización manteniendo un equilibrio gracias, entre otros a los factores de crecimiento. Cuando se altera el balance normal entre los factores de crecimiento y señalización, aparece la HBP, produciéndose un aumento de FGF2, FGF7 y FGF10 y una disminución de TGF $\beta$ -2. Esto inhibirá el crecimiento epitelial y estimulará el crecimiento de la célula estromal. Además, encontramos que en pacientes con HBP la densidad de TGF $\beta$ -2 (TGF $\beta$ -2/vol. prostático) está disminuida, lo que podría ser un parámetro sensible para diferenciar pacientes control de pacientes con HBP en futuros estudios. Se ha descrito que la desregulación en estos FC representaría un “despertar embriológico” del estroma prostático .

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 (50), KGF, IGF o vasculo-endotelial (VEGF) (51). Recientemente, Alonso-Magdalena y cols. han 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 matriz extracelular (52). Estos autores reconocen la necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos de inducción de esta patología en humanos, por el momento desconocidos por la ausencia de modelos animales, y su diferenciación con los procesos que acontecen en la zona periférica de la próstata también incluida por la relación andrógenos-RA. Además, sugieren el papel central de TGF $\beta$  en el desarrollo de HBP, un factor pleiotrófico que induce la diferenciación muscular lisa e incrementa la matriz extracelular alrededor de las células estromales (53), pudiendo constituir una futura diana de tratamiento precoz que evita la progresión.

Por último, el factor derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGF $\beta$ ), estimula la secreción de ácido hialurónico (54), uno de los componentes de la matriz extracelular. Este hecho se ha relacionado de manera importante con la etiología de la HBP (55).

#### **1.2.2.3 Proteínas de la invasión: Metaloproteinasas**

Las metaloproteinasas (MMPs) tienen un papel menos importante en la HBP, de hecho, múltiples trabajos hablan de una menor expresión de MMP-2 en HBP en comparación al estroma del CaP, así como una ausencia casi total de la expresión de MMP-9 (9). En otros sin embargo, se habla de una mayor expresión de MMP-2 (56) en HBP, por lo que parece que aún, su expresión y su papel en el desarrollo de esta patología no está claro.

#### **1.2.2.4 Inflamación**

En relación con el papel de la inflamación, la sobreexpresión de algunas interleuquinas (IL-8, IL-16, IL-17...) y de ligandos de quimioquinas (CCl2...) se ha relacionado con el desarrollo de los nódulos hiperplásicos característicos de la HBP, aunque por mecanismos no bien aclarados (57). El transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3), es otra proteína relacionada con la inflamación que es activada por IL-6, promueve la migración de las células mastocitarias al estroma prostático, donde estimulan la proliferación de las células de HBP. Se está estudiando la posibilidad de bloquear IL-6 o STAT3 con el fin de evitar que las células mastocitarias ejerzan su acción y frenar la proliferación (58).

## 1.3 CÁNCER DE PRÓSTATA

### 1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

Otro escenario es el CaP, que es el más común de los tumores malignos en varones. En 2008, casi 62 de cada 100.000 fueron diagnosticados de CaP y ese mismo año fallecieron por el tumor 248.500 hombres a nivel mundial siendo, por lo tanto, una de las causas de mayor mortalidad por cáncer en el sexo masculino (59). En el año 2012 se diagnosticaron 1,1 millones de casos en todo el mundo, correspondiendo al 15% de todos los tumores, (60) con una mayor prevalencia en países desarrollados, al menos el 70% de los casos (759.000).

La incidencia del CaP varía según las áreas geográficas. En Australia/ Nueva Zelanda y América del norte las tasas estandarizadas por edad (TSE) son altas, en torno a 111,6 y 97,2 por 100.000 varones respectivamente. En Europa occidental y septentrional las TSE son del 94,9 y 85, respectivamente. Esto se debe en gran parte al uso de PSA en el cribado y al envejecimiento de la población. En el extremo contrario, las incidencias más bajas se encuentran en Asia oriental y sudoriental con TSE de 10,5 y 4,5, respectivamente (60, 61).

En cuanto a mortalidad, representa la quinta causa de muerte en varones en el mundo (6,6% de la mortalidad global), estimándose 307.000 muertes en 2012. La tasa y tendencia de mortalidad presentan una menor variación que la de incidencia debido al menor efecto del empleo de PSA como factor determinante de cuantificación de mortalidad. Por el contrario, en los países mediterráneos de Europa, las tendencias de supervivencia siguen a las de incidencia (62), observándose un aumento de ambas, especialmente a los 60-70 años. No obstante, una gran proporción de estos pacientes fallecerán por causas distintas al tumor (63).

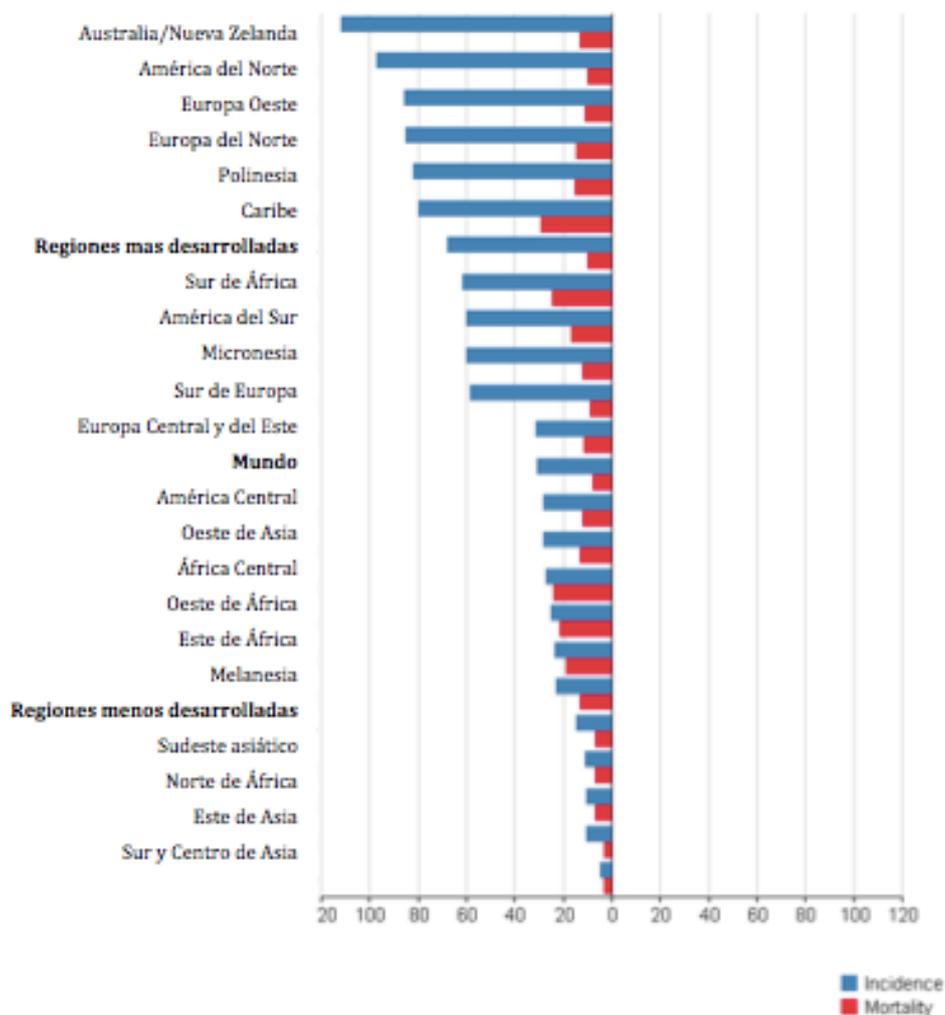
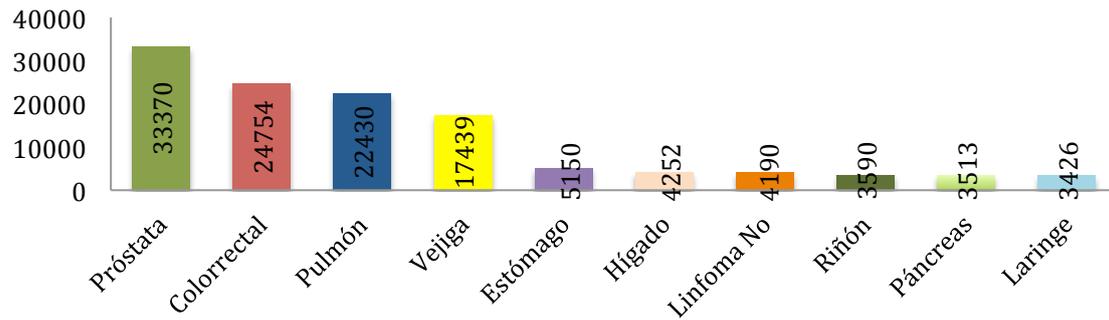


Figura 5. Tasas de incidencia y mortalidad estimadas estandarizadas por edad por 100.000 varones, GLOBOCAN 2012 (64).

En España, la incidencia es de unos 77 casos por 100.000 varones, con una situación intermedia-baja en el contexto de la Unión Europea (65). Previamente era el tercer tumor más frecuente en varones tras el cáncer de pulmón y colorrectal, sin embargo, según los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en el año 2015 fue el tumor más frecuente en hombres con 33.370 casos. La tasa de mortalidad en el año 2014 fue de 15,23 por 100.000 varones (66), siendo el tercer tumor con mayor mortalidad en el sexo masculino. Esta tasa es, sin embargo, significativamente menor que la de años previos.



**Figura 6. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en varones en España en el año 2015 (REDECAN) (66).**

Actualmente, el cribado poblacional para el CaP es controvertido, con estudios a favor y en contra. Se recomienda una estrategia adaptada al riesgo para la detección temprana basándose en la cifra inicial de PSA (67). La sospecha diagnóstica se basa en el tacto rectal y/o la determinación de PSA, si bien la especificidad de este marcador es baja (68). Una vez se tiene sospecha, el diagnóstico se debe confirmar mediante una biopsia de próstata. Es un procedimiento invasivo, no exento de complicaciones que aparecen hasta en el 37% de los casos. El actual “gold standard” consiste en la obtención de 10-12 cilindros de tejido prostático con ayuda de un ecógrafo, ya sea vía transrectal o transperineal.

Para intentar seleccionar de manera más correcta a los pacientes que se beneficiarán de una biopsia de próstata y evitar así sobrediagnósticos y sobretamientos, se están desarrollando distintos biomarcadores y técnicas de imagen más precisas.

El primer biomarcador que aparece para su utilización en la práctica clínica es el “Prostate Cancer Gen 3” (PCA3), aprobado por la “Food and Drug administration” (FDA) en el año 2012. Se trata de un marcador genético específico para CaP que cuantifica el gen en una muestra de orina recogida tras un masaje prostático. Cuanto mayor es la puntuación de PCA3, mayor es la probabilidad de tener una biopsia positiva con un punto de corte de 35. Sin embargo, su valor en discriminación de CaP agresivo o de alto riesgo es limitado. Actualmente su

indicación está limitada a pacientes con biopsia previa negativa y sospecha mantenida de CaP.

Como marcador molecular disponemos del “4K score”. A través de esta técnica se establece una relación entre parámetros clínicos (edad, tacto rectal e historia previa) y biomarcadores (PSA, calicreínas y otras proteínas). Mediante un algoritmo se determina la probabilidad de padecer CaP de alto riesgo. 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 (69).

El índice de salud prostática (PHI) es una combinación de los niveles de diferentes isoformas de PSA que indican la probabilidad de CaP; PSA total (tPSA), [-2] proPSA y PSA libre (fPSA) con la siguiente fórmula: [-2] proPSA/fPSA x  $\sqrt{tPSA}$ .

**Tabla 3. Probabilidad de CaP según PHI.** PHI; Índice de salud prostática.

<b>PHI</b>	<b>Probabilidad de</b>	<b>cáncer de próstata</b>
0-21	8,4%	Bajo
21-40	21%	Medio
+40	44%	Alto

El PHI no ha demostrado ser más eficaz que el porcentaje de fPSA y la densidad de PSA (PSAd) (70), aunque si se asocia a Resonancia Magnética multiparamétrica (RMmp) parece que mejora la predicción de cáncer global y de CaP significativo en comparación con la RMmp combinada con PSA (71).

En los últimos años, han aparecido marcadores génicos que pueden ser detectados en un análisis de orina. Un ejemplo es el “Select MDx”, que incluye el valor del ARNm de una combinación de biomarcadores génicos (HOXC6 y DLX1), la edad, el PSA, el volumen prostático, el tacto rectal y la historia familiar. En pacientes con PSA sérico > 4 ng/ml y <8 ng/ml, el área bajo la curva (AUC) de la combinación de HOXC6 y DLX1, es mayor que la del PSA sérico (72). Con estos parámetros se consigue identificar a los varones con alto riesgo de CaP de alto

grado, que podrían beneficiarse de una biopsia o una RMmp frente a varones de bajo riesgo que pueden eludir procedimientos invasivos innecesarios evitando así el sobrediagnóstico y, por tanto, como decimos, el sobretratamiento (73). Tiene un elevado valor predictivo negativo (VPN), 99,6% para pacientes con Gleason  $\geq 8$  y 98% para pacientes con Gleason  $\geq 7$  (73).

En cuanto a las técnicas de imagen, la RMmp está cambiando el paradigma del diagnóstico del CaP. Hasta el momento actual las biopsias de próstata se hacían de manera aleatoria, haciendo un mapeo de toda la glándula prostática. La RMmp permite, a través del sistema de gradación “Prostate Imaging – Reporting and Data System”, en su 2ª versión (PIRADS V2), identificar áreas sospechosas, dirigir la biopsia y realizar uno o varios disparos selectivos.

Esta prueba no sólo aporta información anatómica de la glándula, también datos sobre el volumen, vascularización y celularidad. Se ha descrito un VPN de hasta el 80% para esta técnica, siendo fundamentalmente útil en la detección de tumores de alto riesgo, lo que la convierte en un método de triaje atractivo (74). Además, mediante RMmp y fusión de imágenes se puede aumentar la rentabilidad diagnóstica de la biopsia de próstata realizando disparos dirigidos por imagen sobre la lesión principal. Uno de los problemas de este sistema es la escasa disponibilidad y los costes elevados que supone.

**Tabla 4. Sistema de gradación PIRADS v2.** PIRADS: Prostate Imaging – Reporting and Data System; CCS: cáncer clínicamente significativo.

1	Intensidad de señal homogénea (normal).	PIRADS 1: Muy baja probabilidad de CCS
2	Nódulo encapsulado, circunscrito, hipointenso o de intensidad de señal heterogénea.	PIRADS 2: Baja probabilidad de CCS
3	Intensidad de señal heterogénea de márgenes mal definidos. Otras que no se pueden categorizar como 2, 4, ó 5.	PIRADS 3: Probabilidad intermedia de CCS
4	Foco de hiposeñal lenticular o no circunscrito, mal delimitado, homogéneo y de <1,5 cm de diámetro mayor.	PIRADS 4: Alta probabilidad de CCS
5	Igual que 4 pero > 1,5 cm de diámetro mayor o que presenta clara extensión extracapsular/comportamiento invasivo.	PIRADS 5: Muy alta probabilidad de CCS

Se ha visto una correlación entre la puntuación “Select MDx” y los hallazgos en RMmp. Así, ésta es significativamente más alta en pacientes con lesión positiva en la prueba de imagen, habiendo incluso encontrado diferencias de puntuación entre PIRADS 3 y 4 y entre PIRADS 4 y 5 (75).

En cualquier caso, el diagnóstico final del CaP se basa en el análisis anatomopatológico de las muestras obtenidas en la biopsia. Se identifica la estirpe del tumor, aportando datos sobre su arquitectura celular mediante la clasificación de Gleason. En el año 2014, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) renovó esta clasificación disminuyendo el número de grados de CaP, numerándolos del 1 al 5 (76), logrando un mejor valor predictivo pronóstico cuando se incluye en un perfil de riesgo como el de D’Amico (77). Por el momento es el único factor pronóstico del que disponemos.

**Tabla 5. Clasificación ISUP 2014.** ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica

<b>Suma de Gleason</b>	<b>ISUP 2014</b>
6 (3+3)	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 ó 3+5 ó 5+3)	4
9 (4+5) ó (5+4) y 10 (5+5)	5

Pero únicamente un tercio de los pacientes sometidos a biopsia de próstata llegarán al diagnóstico de CaP, el resto, continuarán con parámetros clínicos elevados, como el PSA, que sugieran la existencia del mismo (78). Muchos de ellos serán sometidos a una segunda biopsia e incluso tercera o cuarta, lo que supone un procedimiento invasivo no exento de complicaciones y costes adicionales (79). Para tratar de evitar nuevas biopsias innecesarias, aparece “Confirm MDx”. El efecto del campo epigenético es un mecanismo molecular por el cual las células adyacentes al foco tumoral pueden contener cambios de metilación del DNA, lo que puede ser histológicamente indetectable pero objetivado por el test de PCR específica de metilación (80-83). Este concepto es la base de actuación de “Confirm MDx”. Se ha demostrado que niveles bajos de metilación de DNA en pacientes con

biopsia de próstata negativa tiene un VPN de 96% para tumores de alto grado (84), lo que permitiría reducir muchas segundas biopsias (85).

Con todo lo anteriormente descrito, se demuestra que no existen a día de hoy herramientas que permitan diagnosticar con certeza el CaP y, por ello, se están buscando nuevas y combinaciones de las ya existentes. A continuación se representa en la figura 7 un diagrama de posibilidades con las herramientas disponibles.



**Figura 7. Diagrama de decisiones con herramientas disponibles para el diagnóstico de CaP.**

### 1.3.2 FACTORES TISULARES DERIVADOS DEL ESTROMA

Como ya se ha comentado, no se dispone aún de datos exactos sobre qué perfil de pacientes son subsidiarios de un tratamiento más o menos agresivo en función de su tipo de tumor. Por esta razón, se están desarrollando nuevos marcadores y modelos matemáticos que intentan optimizar recursos diagnósticos y posteriores tratamientos, es decir, minimizar sobrediagnóstico y sobretatamiento sin reducir la identificación de CaP clínicamente significativo. En

este sentido se desarrollan líneas de investigación sobre los cambios que se producen en el estroma prostático durante la carcinogénesis, a través de cultivos celulares de fibroblastos.

Así, se ha objetivado una expresión desigual de un número limitado de moléculas según la patología e histología del estroma prostático, lo que podría resultar de interés para la identificación de nuevos marcadores en CaP.

En un trabajo previo hemos podido analizar los fibroblastos tumorales cultivados procedentes de focos tumorales de pacientes con CaP. En este estudio, además de poner a punto la técnica necesaria, se han detectado algunos factores que pueden expresarse específicamente en el estroma tumoral en relación al no tumoral, marcadores que han sido escasamente investigados (56).

Existen pocos datos publicados de los factores estromales implicados en el desarrollo del CaP. A continuación enumeramos algunos de las más importantes y describimos su acción.

#### **1.3.2.1 Receptor androgénico**

El RA tiene un importante papel en el desarrollo y progresión del CaP. Así, parte del tratamiento del CaP consiste en la modificación de los andrógenos o el RA y, por tanto, regulando la transcripción de determinados genes. Se trata en este caso de la terapia de deprivación androgénica (TDA). Sin embargo, el efecto de este tipo de tratamiento es transitorio. Pacientes tratados con TDA, después de un periodo de tiempo variable, con una mediana de unos 25-30 meses, pasan a una fase de resistencia a la castración, lo que conlleva un aumento en la expresión del RA o mutaciones que finalmente darán lugar a una resistencia a los andrógenos.

Se ha demostrado que, tras el proceso de iniciación, la progresión tumoral con invasión local y metástasis se ve facilitada por el estroma (86-90), bajo la influencia androgénica. Así, 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. También se ha asociado con una elevada tasa de recidiva tras prostatectomía radical (PR) (91, 92), pudiendo reaparecer, dicha expresión incluso meses después del inicio de la castración (93).

El RA está implicado en el desarrollo de la fase final del CaP, la de resistencia a la castración (CPRC). Esta se define como la progresión de la enfermedad bioquímica o radiológica en presencia de testosterona a niveles de castración, <50 ng/dl (94). Se ha demostrado que tanto el RA como los andrógenos tienen un papel crucial, identificándose múltiples mecanismos mediados por el RA que conferirán esta resistencia a la TDA. Algunos de estos se enumeran a continuación:

- **Amplificación y sobreexpresión del RA:** Se ha demostrado que no hay amplificación del RA en las muestras de HBP, sólo en un 2% del CaP localizado y en el 20-30% de CPRC. Esto sugiere que es una respuesta adaptativa a TDA más que un mecanismo adaptativo inherente al propio cáncer (95).
- **Mutación del RA:** Muy raras en CaP no tratado, pero aparecen en el 15-20% de los pacientes con CPRC (96) y hasta en el 40% de los tratados con antagonistas del RA (97).
- **Correguladores del RA:** Se han identificado más de 150 moléculas que pueden alterar la actividad transcripcional a través de diferentes procesos. Los andrógenos regulan el 30% de los coactivadores y la sobreexpresión de estos se ha relacionado con mayor agresividad clínica del CaP (98).
- **Activación aberrante del RA:** Diferentes moléculas son capaces de activar al RA a concentraciones subfisiológicas de andrógenos. Algunas de éstas son IL-6, EGRF, IGF1, Her-2/neu, SCR quinasa etc (99).

- **Variantes “Splice”:** O variante “corte y empalme” (ARV). La expresión de ARV está asociada a un peor pronóstico y desarrollo de CPRC. Las principales son: ARV1, ARV7, ARV9 y ARV56 (100). ARV7 ha sido la más estudiada y se ha correlacionado con riesgo de recurrencia del tumor tras tratamiento primario y con peor supervivencia. Además, se ha visto una resistencia al tratamiento con enzalutamida o abiraterona en pacientes que expresan ARV7 (101, 102).
- **Producción de andrógenos intratumorales y suprarrenales:** A pesar de la castración, existen cantidades fisiológicamente significativas de andrógenos intraprostáticos, cantidades suficientes para mediar la activación del RA (103, 104).

#### 1.3.2.2 Factores de crecimiento

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 (105). Además, TGF $\beta$  regulará la producción de RNAm del FGF2 (106) y estimulará la activación del Factor Nuclear kappa- $\beta$  (NFk $\beta$ ) en las líneas celulares PC3 haciéndolas, de este modo, resistentes a la apoptosis (107). En la superfamilia de los FGFs, el FGF2 además del FGF7 interactuarán con los andrógenos y el receptor androgénico en la próstata, habiéndose encontrado sobre expresados en los carcinomas prostáticos (108). La nudix hidrolasa 6 (NUDT6), un elemento de la superfamilia de las nudix-hidrolasas que regula la expresión de FGF2 durante la carcinogénesis, también podría tener un papel central en el desarrollo del CaP (109). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de FGF10 en los fibroblastos de la próstata induce experimentalmente la formación de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) multifocal en el epitelio adyacente (110).

Por otro lado, 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 (105).

### 1.3.2.3 Proteínas de la invasión: Metaloproteinasas

Distintos trabajos han demostrado una sobreexpresión de algunos genes codificadores de las MMPs de matriz que estarían implicadas en la degradación de las membranas basales en el CaP en ratas (111). Específicamente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de diversas MMPs como MMP-9 o TIMP-1 (“Tissue Inhibitor” of MMP-1) en los fibroblastos estromales se asocia a un incremento de la probabilidad de recidiva bioquímica tras PR (112). 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 (113). Este diferente significado pronóstico es novedoso y entra en controversia con resultados de otros grupos que afirman una mayor expresión de MMP-2 en CaP y específicamente superior a la que se encuentra en HBP (114). 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 (115). Otra MMP, la MMP-11 (estromalisina-3), se encuentra en grandes porcentajes en el estroma de CaP en relación con HBP (116), encontrándose también sobreexpresada en pacientes que sufren recidiva bioquímica tras PR (113).

### 1.3.2.4 Inflamación y chaperonas

La IL-6 es una proteína inflamatoria producida por diferentes tipos de células, incluidas las del estroma prostático. Cuando IL-6 se une a su receptor, se produce la activación de STAT3 que se trasloca al núcleo e inicia la transcripción de genes. Uno de los papeles clave es la activación de NF $\kappa$ B, que a su vez regula la transcripción de proteínas inflamatorias (117).

En cuanto al estroma tumoral prostático, hará que se produzca IL-6, cuyos receptores se encuentran tanto en el epitelio como en el estroma, habiéndose visto una importante elevación de sus niveles durante la carcinogénesis. La IL-6 promueve el crecimiento de la mayoría de las líneas de células prostáticas (118) y su bloqueo experimental ha demostrado que induce la apoptosis e inhibe la proliferación tumoral y la progresión hacia el estado de independencia androgénica en modelos de xenotrasplante de tumores prostáticos (119). Recientemente la determinación de esta interleuquina ha sido incorporada a

algunos nomogramas predictivos (120). Otra citoquina pro-inflamatoria secretada por las células T activadas, la interleuquina 17 (IL-17), se une a un receptor específico (IL17-RB) que es expresado en el estroma prostático, habiéndose demostrado que su sobreexpresión se relaciona con altos grados de Gleason (121).

HSF-1 es un monómero inactivo que forma parte de un complejo citoplasmático con otras chaperonas (proteínas de choque térmico) como HSP90 y HSP70. Por el momento, su aplicación clínica es limitada pero puede ser una diana importante de tratamiento mediante el desarrollo de sus inhibidores dado su papel central en muchos procesos de desarrollo tumoral (122). Recientemente, se ha demostrado una elevación de los niveles de HSF-1 en líneas celulares agresivas (metastásicas) de CaP (123).

HSPA1A (HSP70) tiene un efecto antiapoptótico, que modula la respuesta al estrés y de HSF-1. Se han realizado trabajos que demuestran su papel en las líneas celulares de CaP, PC-3 and DU-145 (124). Aunque sus efectos realmente son desconocidos, podría constituir, al igual que HSF-1 un mecanismo de control importante en el crecimiento celular de diversos procesos prostáticos.

STAT3 es una oncoproteína bien conocida que se encarga de regular múltiples vías de señalización. Media la señal de transducción desde el espacio extracelular al núcleo en respuesta a la activación de citoquinas, factores de crecimiento y otras oncoproteínas (125). En pacientes con CaP se encuentra activada, promoviendo la síntesis alterada de proteínas clave, responsables de la progresión de la carcinogénesis (126).

Finalmente, NF $\kappa$ B juega un importante papel en la proliferación y diferenciación celular. Además, participa en la regulación de la supervivencia y la apoptosis (127). Sin embargo, el significado biológico de su activación en los tejidos celulares, todavía no se conoce bien (128). Muchos estudios han descrito la activación constitutiva de NF $\kappa$ B en diversos tumores como el de ovario, mama, páncreas y el CaP. La sobreexpresión de éste en el núcleo de las células prostáticas, se ha relacionado con tumores de fenotipo más agresivo, quimiorresistencia (129) y metástasis (130).

### 1.3.2.5 Interacción epitelio/estroma

La proteína alfa de activación de los fibroblastos (FAP) es una glicoproteína con actividad proteolítica que está sobre expresada en la superficie de los fibroblastos reactivos de la mayoría de los carcinomas, pero no en los fibroblastos normales ni tampoco en el epitelio tumoral, por lo que puede ser un buen candidato a factor pronóstico y a diana terapéutica de CaP (131).

Las células de CaP tienen una alta afinidad por el hueso, siendo capaces de albergarse en él debido a propiedades intrínsecas (132). Las células tumorales migran principalmente al nicho endostial, donde el hueso está formado por osteoblastos que secretan factores como el factor derivado de célula estromal-1 (CXCL12) (133) y expresan cadherina 11 (CDH11) (134). Este último es un mediador entre las células tumorales y los osteoblastos en las metástasis óseas (135). Por este motivo, parece que CDH11 se encuentra en altas concentraciones en tumores metastásicos, así como CXCL12.

Por último, respecto a C-X-C Ligando de quimiocina 14 (CXCL14), sabemos que es un potente inductor de las funciones precancerígenas de los CAFs (136). En diversos estudios se ha estudiado la sobreexpresión de CXCL14 en las células tumorales, describiéndose efectos antitumorales y antiangiogénicos (137, 138). En cambio otros estudios indican actividad procancerígena de esta quimiocina, favoreciendo el desarrollo celular y el crecimiento de vasos sanguíneos y monocitos cuando se sobre expresa en los CAF y en el estroma tumoral (139, 140). La señalización intracelular de esta molécula es poco conocida y se ha descrito como una función que, dependiendo del contexto, puede ser pro o antitumoral (141).

## 1.4 ESTUDIO DE FACTORES MOLECULARES EN CULTIVOS CELULARES

El conocimiento de los mecanismos moleculares y genéticos claves que subyacen en la génesis del CaP es aún limitado, sobre todo cuando se compara con el existente en otros tumores como el cáncer de colon o mama. Los modelos de cultivo celular *in vitro* de muestras obtenidas de tumores humanos, son críticos para definir los mecanismos de iniciación y desarrollo del cáncer y, de esta manera, poder establecer estrategias diagnósticas y predictivas, así como regímenes terapéuticos específicos (142). No obstante, estos modelos no han sido bien desarrollados hasta hace poco tiempo en CaP (143). Los modelos comerciales existentes actualmente (LNCaP, DU-145, PC-3...), por un lado son heterogéneos en origen y, por otro, derivan de lesiones metastásicas, por lo que no resultan adecuados para estudiar los fenómenos de progresión tumoral. Asimismo, dado el tamaño de la próstata, su localización, dificultad de obtención de las muestras y la heterogeneidad de sus células, el cultivo celular realizado directamente sobre los especímenes prostáticos humanos resulta complejo (144).

Como ya se ha comentado desde hace unos años nuestro grupo de investigación viene recogiendo muestras de tejido prostático humano para cultivar los fibroblastos y estudiar las características del estroma. En éste, se han reconocido factores que pueden estar influyendo la evolución de diversos carcinomas a través de una comunicación directa y recíproca con el epitelio tumoral.

Dada su larga historia natural, 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, cuyas alteraciones parecen más estables y homogéneas que las del epitelio neoplásico (145). Además, las modernas técnicas de estudio molecular de alto rendimiento permiten identificar multitud de procesos relevantes en la carcinogénesis y progresión de la enfermedad, así como diversos mecanismos que pueden alterar determinados genes clave como

anomalías cromosómicas (pérdidas o ganancias), mutaciones, translocaciones o hipermetilaciones (146).

Tampoco existen muchos estudios que hayan identificado rasgos diferenciales del estroma de pacientes con CaP en relación con tejido normal basados en el estudio de los fibroblastos tumorales cultivados, y menos aún con el estroma de HBP. Algunos experimentos de recombinação tisular han demostrado que el estroma procedente de la HBP muestra una capacidad de inducir el crecimiento de células epiteliales completamente diferente a las células cultivadas procedentes del estroma peritumoral, llegándose a producir tumores agresivos cuando las células epiteliales no neoplásicas se cultivan con los fibroblastos tumorales (20).

Zhao y cols. 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 (147). Parece, por tanto, que existen importantes diferencias moleculares entre las áreas prostáticas que se manifiestan en una respuesta diferente a los andrógenos, imprescindibles para el crecimiento de la próstata y también para el desarrollo de ambas patologías. No obstante, si bien reconocen la importancia de la interacción epitelio-estroma, los escasos estudios que se han llevado a cabo no han obtenido resultados definitivos (16) (148). En uno de ellos, que se ha centrado en la comparación del estroma del cáncer y la HBP, se ha destacado el papel de las MMPs estromales, que tienen una expresión diferente en cada una de las patologías referidas (9).

En definitiva, parece que el estroma alberga procesos profundamente imbricados en el desarrollo tanto de la HBP como del CaP, dos entidades muy frecuentes en los varones a partir de cierta edad y que constituyen un problema socio-sanitario que va incrementándose con el envejecimiento de la población. El estroma es especialmente atractivo en este sentido por dos motivos: está presente en el seno de ambas lesiones en prácticamente todos los pacientes y su genoma es más estable que el de las células epiteliales (86). Los fibroblastos son un

componente clave del estroma tumoral que pueden ser aislados de muestras humanas para ser empleados en investigación básica y cuya identificación y aislamiento hemos conseguido optimizar en nuestro laboratorio. Su empleo en cultivo puede favorecer un conocimiento mejor de los rasgos diferenciales de dos lesiones que se producen en zonas diferentes de la próstata y que tienen un comportamiento completamente diferente, sin conocer muy bien a qué se debe dicha diferencia. Además, el estudio de fibroblastos en cultivo facilita la identificación de biomarcadores más fiables que puedan servir como dianas terapéuticas en el futuro. Igualmente, estos cultivos permitirán comprobar su comportamiento con células epiteliales procedentes de diversas líneas celulares empleando los modernos sistemas de co-cultivo para individualizar diferentes modelos de HBP y de CaP, inexistentes por el momento.

Los datos que hemos podido demostrar en una serie limitada de casos parecen confirmar la presencia de ciertos factores que podrían diferenciar procesos como HBP o CaP, en diferentes áreas de la próstata (56). Así, IL-17RB presenta una expresión aumentada en los CAFs respecto a los fibroblastos de HBP. Además se encontraron niveles elevados de MMP-11 y FGF7 en los CAFs de tumores localizados y metastásicos. Por último, se objetivaron expresiones elevadas de RA, MMP-11 y HSPA1A en los CAFs de CPRC. Creemos que todos estos hallazgos deben ser confirmados empleando la misma metodología en series más amplias de casos, obteniendo fibroblastos del estroma tras la optimización de las técnicas que hemos llevado a cabo en los estudios previos.

## *2. Hipótesis*

---



Existen claras evidencias de que el microambiente estromal influye de una manera definitiva en el desarrollo de la HBP y del CaP, ambas patologías muy comunes en varones y con una repercusión socio-sanitaria evidente. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el estroma regula el crecimiento de las células epiteliales en ambas entidades son desconocidos, así como los procesos que dan lugar a ambos cuadros histopatológicos en zonas diferentes de la misma glándula.

Desde hace unos años se reconoce que el estroma es un inductor del crecimiento y diferenciación del epitelio glandular prostático asociado a andrógenos, existiendo a su vez un mecanismo recíproco, que en conjunto juegan un papel central en la carcinogénesis y progresión del CaP. Así, la existencia de los denominados CAF, ha sido recientemente descrita en el CaP. Igualmente, en los últimos años se han determinado algunos factores diferenciales que estarían sobreexpresados en presencia de este estroma reactivo tumoral y que hemos podido analizar en un estudio previo sobre cultivos de fibroblastos del estroma tumoral ya publicado en 2016 (56). Por otro lado el crecimiento prostático secundario a la HBP que se produce a partir de los 40 años, en los varones en el área transicional de la glándula, tiene también una influencia claramente estromal y probablemente diferente a la de la mayoría de los tumores que se producen en la zona periférica. Se han demostrado algunas diferencias genéticas relacionadas con la interacción estroma-epitelio que podrían explicar una susceptibilidad diferente área-dependiente, pero realmente los marcadores estromales específicos implicados han sido pobremente analizados hasta ahora, con escasas publicaciones que busquen patrones diferenciales entre ambas zonas.

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. Entre las ventajas del cultivo de células procedentes de próstata

humana destaca, 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.

Por todo ello, hemos planteado un estudio prospectivo de las muestras procedentes de pacientes sometidos a: biopsia múltiple prostática por sospecha de cáncer y pacientes en fase de resistencia a la castración, a resección transuretral de próstata (RTUp) o adenomectomía prostática por HBP. La finalidad será comparar las características del estroma de las diferentes áreas de la zona periférica prostática en los casos que finalmente sean diagnosticados de una neoplasia, diferenciando las zonas con tumor de las que no lo tienen. Igualmente, se analizará el estroma de las muestras de HBP, comparándolos con el de las muestras de pacientes con tumor. El análisis de algunos factores producidos esencialmente en el estroma permitirá conocer rasgos diferenciales de la carcinogénesis prostática y del desarrollo de la HBP. 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 debe ser limitado por la complejidad técnica de los cultivos celulares, pretendemos obtener una serie suficiente para responder a los objetivos que se expresan posteriormente.

### *3.Objetivos*

---



1. Investigar la expresión génica de 20 factores derivados del estroma, incluyendo el receptor androgénico, factores de crecimiento (FGF7, FGF10, NUDT6, HGF, TGFB1 y PDGF $\beta$ ), proteínas implicadas en la invasión (MMP-2, MMP-9 y MMP-11), factores inflamatorios (IL-6, IL-17RB, STAT3 y NF $\kappa$  $\beta$ ), chaperonas (HSF-1 and HPA1A) y proteínas de la interacción estroma-epitelio (CDH11, FAP, CXCL12 and CXCL14) por los fibroblastos en el CaP.
2. Investigar una posible relación de la expresión de esos factores en los fibroblastos del tejido tumoral con las características clínico-patológicas de los pacientes y sus tumores.
3. Comparar el perfil génico de los fibroblastos situados en los diferentes focos tumorales en los casos de tumores multifocales.
4. Realizar un estudio comparativo de la expresión de esos factores por los fibroblastos de tejido tumoral con la de los fibroblastos no asociados a tumor y la de los fibroblastos de HBP.
5. Analizar el perfil génico de los fibroblastos de los carcinomas de próstata localizados (CPL), en relación a la de los carcinomas metastásicos (CPM+) y la de los pacientes sometidos a terapia de deprivación androgénica.
6. Evaluar las diferencias del perfil génico de los fibroblastos de los carcinomas de próstata hormonosensibles en comparación con la de los fibroblastos de los resistentes a la castración.



## *4. Material y métodos*

---



## 4.1 Diseño del estudio

Para la consecución de los objetivos propuestos, se realiza un estudio de obtención de muestras prospectivo, donde se analizan muestras de pacientes con dos diferentes patologías; HBP y CaP. De estos últimos se recogen muestras de los diferentes grupos pronósticos dentro de los tumores localizados, así como muestras en otras fases de la enfermedad; pacientes metastásicos sin haber iniciado tratamiento, pacientes sensibles a la castración y pacientes resistentes a la castración.

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

El seguimiento se realiza en la consulta de urología según los protocolos correspondientes a las guías de la Asociación Europea de Urología (149).

## 4.2 Población de estudio

*Criterios de inclusión.*

- Cáncer de próstata.
  - Pacientes con sospecha CaP localizado. Tras confirmar el diagnóstico se sometieron a tratamiento con intención curativa, PR o radioterapia (RT).
  - 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 inició tratamiento con deprivación androgénica.

- Pacientes sometidos a deprivación androgénica. Se balancearon para tener un grupo de tumores sensibles y resistentes a la castración. Se obtuvieron muestras de la zona tumoral previamente biopsiada durante el diagnóstico de la enfermedad (no sometidos a prostatectomía ni RT radical).
- HBP. Pacientes sometidos a RTUp o adenomectomía de próstata por HBP clínicamente significativa sin respuesta a tratamiento farmacológico.

#### ***Criterios de exclusión.***

- CaP. Historia previa de otras neoplasias malignas, terapia neoadyuvante, desarrollo de un segundo tumor primario e insuficiente cantidad de tejido para la obtención de células para cultivo.
- HBP. Tratamiento durante los seis meses previos con inhibidores de 5-alfa reductasa y ser portador de sonda vesical permanente.

#### **Definición de pacientes CPRC**

1. Tres elevaciones consecutivas de PSA, separadas por al menos una semana, con dos incrementos del 50% sobre el nadir y siempre que este incremento de lugar a un PSA mayor de 2 ng/ml, con niveles de testosterona inferiores a 50 ng/dl ó 1.7 nmol/l.
2. Progresión de lesiones óseas  $\geq 2$  en gammagrafía ósea o progresión de lesiones de tejidos blandos según los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST).

## 4.3 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 3 g 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, uno de cada área. Por tanto, de cada muestra prostática había 3 cilindros, dos para diagnóstico anatomopatológico y otro para cultivo celular, según se representa en la figura 8.

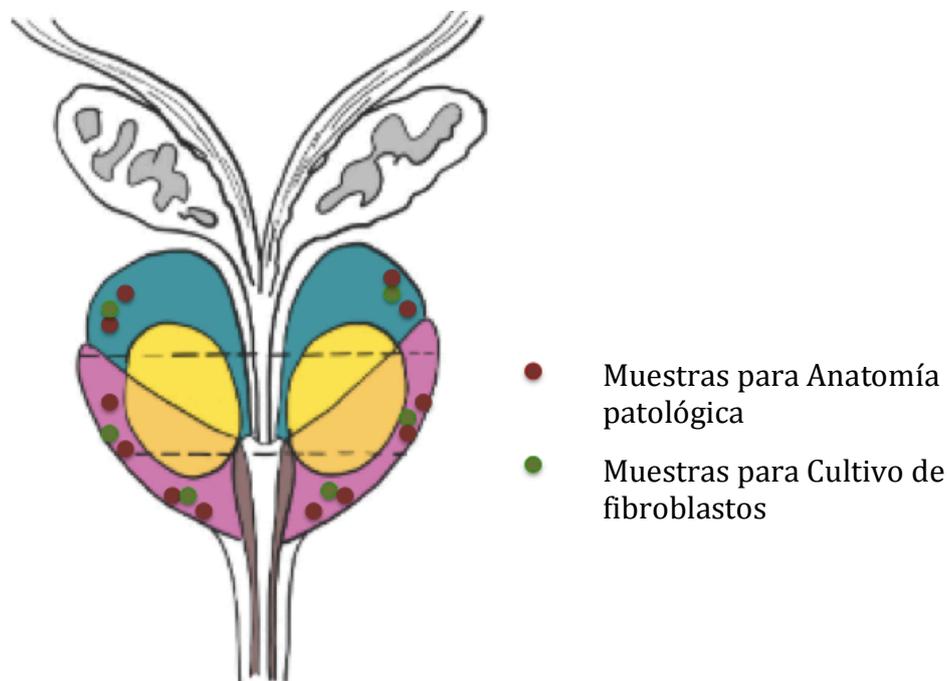


Figura 8. Esquema de biopsia de próstata.

## **RTU de próstata**

Se realizó la resección de la zona transicional prostática en pacientes con HBP sintomática de la manera habitual, empleando un resector con asa bipolar y suero fisiológico como medio conductor. Se seleccionaron muestras procedentes de la zona hiperplásica para cultivo.

## **Adenomectomía de próstata**

Se realizó por vía abierta retropúbica en todos los casos, siguiendo la técnica de Millin. Una vez extraída la pieza de adenomectomía se seleccionó un fragmento del área hiperplásica para cultivo.

Todas estas muestras se recogieron en medios de cultivo apropiados para ser trasladados en pocas horas al laboratorio donde fueron procesadas.

## **4.4 Tratamientos con intención curativa**

### **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 o con una suma de Gleason en la muestra de la biopsia de siete en los que el nomograma de Briganti indicaba un riesgo > 5% de afectación ganglionar, y en todos los que presentaron una suma de Gleason mayor de 7.

Se determinaron las características del tejido correspondiente al tumor y del de algunas zonas periféricas no tumorales.

## Radioterapia radical

Algunos pacientes fueron sometidos a RT externa o braquiterapia según las características de la enfermedad y preferencias del paciente, seleccionando para este estudio solo los casos con tumores de alto riesgo de la clasificación d'Amico (77).

Estos casos solo fueron útiles para determinar las características de la neoplasia, pero no las de áreas periféricas sin tumor, ya que no existe tejido para confirmar las zonas no tumorales.

### 4.5 Selección de las muestras válidas para el estudio.

Finalmente, para este estudio se seleccionan **88 muestras de 50 casos válidos (n: 50)**, que estimamos que son suficientes para analizar el espectro de los cambios que sufre la próstata durante su envejecimiento y carcinogénesis. De ellos se analizaron **43 casos** correspondientes a **estroma neoplásico (10 casos múltiples), 7 a HBP y 28 a estroma normal**. Los casos con CaP se intentaron elegir de acuerdo a diferentes grupos de riesgo para incluir tumores con diferente agresividad clínica.

Inicialmente se recogieron muestras de un mayor número de pacientes, dada la dificultad de obtener muestras y procesarlas a partir de un ambiente no estéril. Algunas de ellas tuvieron que ser desechadas por contaminación bien durante la obtención de las mismas o durante su procesado en el laboratorio. En el caso de los pacientes tumorales, se obtuvieron 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 PR. Los casos que no cumplieron los criterios de selección, fueron congelados para posibles estudios posteriores.

## 4.6 Obtención de los datos clínicos.

Los datos clínicos y patológicos, tanto de la biopsia tumoral, de la zona sana, de la RTU 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 tras el tratamiento radical durante el tiempo que duró el estudio.

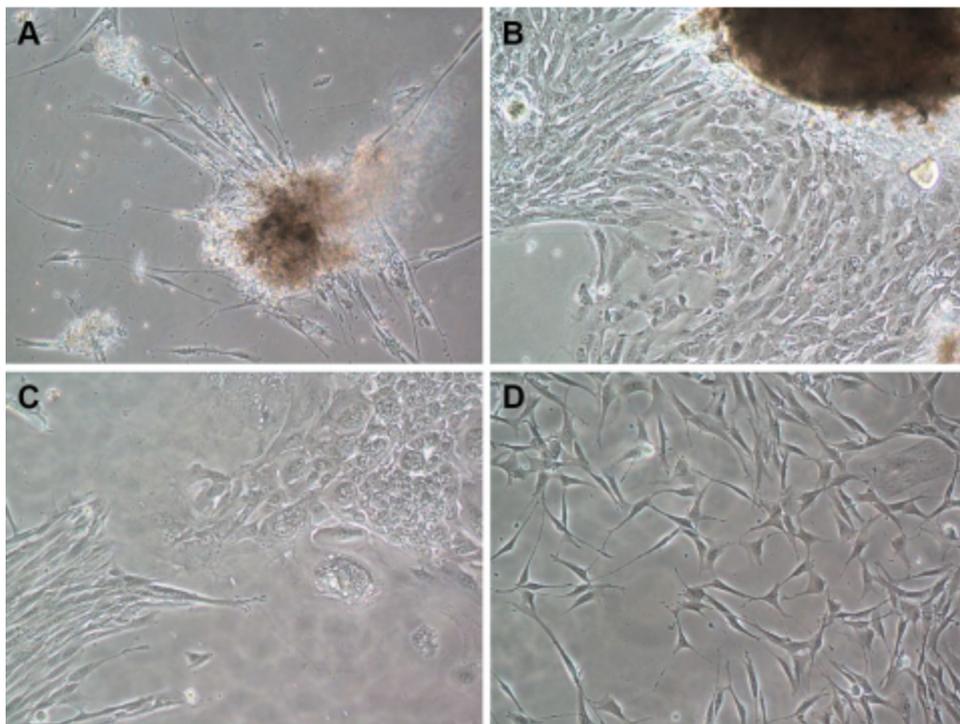
De esta manera, en todos los casos se recogieron los datos clínicos del paciente como la edad, el volumen prostático y el valor de PSA expresado en ng/ml. En cuanto a los pacientes tumorales se recogió la suma de Gleason obtenida en la biopsia (Gleason primario y Gleason secundario), el estadio clínico (cT) y si había tumores múltiples. Se distinguió en ellos la localización del tumor primario, del tumor secundario, del tejido sano cercano al tumor y del lejano. 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). Por último, se recogió el manejo terapéutico de estos dos últimos aspectos, márgenes positivos y afectación ganglionar.

En el seguimiento se estudió la aparición de recidiva bioquímica, considerada cuando el PSA asciende en dos determinaciones consecutivas por encima de 0,2 ng/ml si han sido sometidos a prostatectomía radical o PSA nadir + 2 en los casos tratados con RT siguiendo los criterios de Phoenix (150). Se realizó la primera determinación de PSA a los tres meses de la cirugía y posteriormente se controló cada seis meses hasta completar tres años de seguimiento. Desde el tercer año, los controles se realizaron de forma anual.

## 4.7 Técnica de cultivo de fibroblastos

### 1. Muestras procedentes de RTUp o adenomectomía de próstata.

Se cortaron en piezas de  $1\text{mm}^3$  y se incubaron en presencia de colagenasa tipo I (1,25 mg/ml) en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 48h. Tras la digestión las células fueron lavadas con SFB y colocadas en placas. Las células fueron cultivadas en población mixta hasta la selección de fibroblastos por trypsinización. Se cultivaron a parte las células epiteliales, para su uso en co-cultivos con los fibroblastos; cultivos en pocillos separados por una membrana permeable a factores solubles. Los cultivos puros de fibroblastos fueron expandidos en medio DMEM-F12 con 10% de SFB. Las células se incubaron en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  hasta alcanzar una confluencia del 80%.



**Figura 9. Imágenes representativas de cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento (111).** A) A las 24-48 horas de aislamiento. B) Una semana después del aislamiento. C) Dos tipos celulares morfológicamente diferentes; las células en forma de huso corresponde a los fibroblastos mientras que las células redondeadas están representadas por células epiteliales o tumorales. D) Cultivo de fibroblastos puros.

## 2. Muestras procedentes de biopsias prostáticas

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 durante 48 horas. Tras la digestión las células fueron lavadas con SFB y colocadas en placas. Cada 3-4 días se cambiaba el medio. Cuando las células eran semiconfluentes, se seleccionaron los fibroblastos por trypsinización diferencial. Los cultivos puros de fibroblastos se expandieron en medio DMEM-F12 con 10% de SFB. 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.

## **4.8 Determinaciones moleculares**

Se analizaron los factores de origen estromal que han mostrado interacción 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. Asimismo, se han seleccionado los factores que han sido señalados, en las pocas publicaciones existentes al respecto, como claves en el desarrollo de la HBP, muchos de ellos comunes a los de la carcinogénesis prostática en el área periférica. En un estudio de nuestro grupo ya comentado, hemos determinado algunos factores que se expresan en el estroma tumoral de forma diferente al no tumoral de la zona periférica de la glándula prostática en un número limitado de casos. Por todo ello, se han seleccionado los siguientes representados en la tabla 6.

Los estudios de expresión génica se diseñaron y se llevaron a cabo en 96 placas (Roche®) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a 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

concentración del RNA total eluido se determinó empleando un espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop®. La primera hebra de DNA 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 RNAm se midieron en un ciclador de luz 480 II (Roche®), con 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 6. Tabla de factores estromales analizados en el estudio.** Simb: símbolo; Ref.: Referencia.

<b>Símb</b>	<b>Ref.</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Tipo de gen</b>
RA	102544	Receptor androgénico	Receptor hormonal
NUDT6	118274	Nudix hidrolasa-6	Factor de crecimiento
FGF7	113109	Factor de crecimiento de fibroblastos 7	Factor de crecimiento
FGF10	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
PDGFβ	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
IL-6	113614	Interleuquina 6	Inflamación y chaperonas
IL-17RB	140392	Receptor B de la interleuquina 17	Inflamación y chaperonas
HSF-1	110674	Factor de transcripción de choque térmico 1	Inflamación y chaperonas
HSPA1A	145875	Proteínas de shock térmico de 70 Kda	Inflamación y chaperonas
STAT3	110694	Transductor de señales y activador de transcripción 3	Inflamación y chaperonas
NFκβ	100646	Factor nuclear kappa de las células B activadas	Inflamación y chaperonas
FAP	108274	Proteína de activación de fibroblastos-α	Interacción epitelio/estroma
CDH11	112371	Cadherina 11	Interacción epitelio/estroma
CXCL12	110618	Factor derivado de célula estromal-1	Interacción epitelio/estroma
CXCL14	111260	C-X-C Ligando de quimioquina 14	Interacción epitelio/estroma

Con el objetivo de confirmar la expresión proteica del ARNm analizado por PCR cuantitativa, analizamos por *Western Blot* la expresión de los genes de los factores con expresión significativamente diferencial. Para ello, utilizaremos la fase proteica obtenida durante la extracción de ARN; determinando así, la expresión de proteínas en las mismas condiciones y cultivo que el estudio génico.

## 4.9 Aspectos éticos y de confidencialidad

Dado que el estudio supone un incremento del número de muestras durante la biopsia y una manipulación de las mismas, 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).

## 4.10 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 utilizaron pruebas no paramétricas con determinación de medianas, rangos intercuartiles, U de Mann-Whitney, de Kruskal-Wallis y correlación de Spearman. Se consideró estadísticamente significativa una p valor menor de 0,05. Para el análisis estadístico de empleó el programa IBM® SPSS® Statistics versión 25.

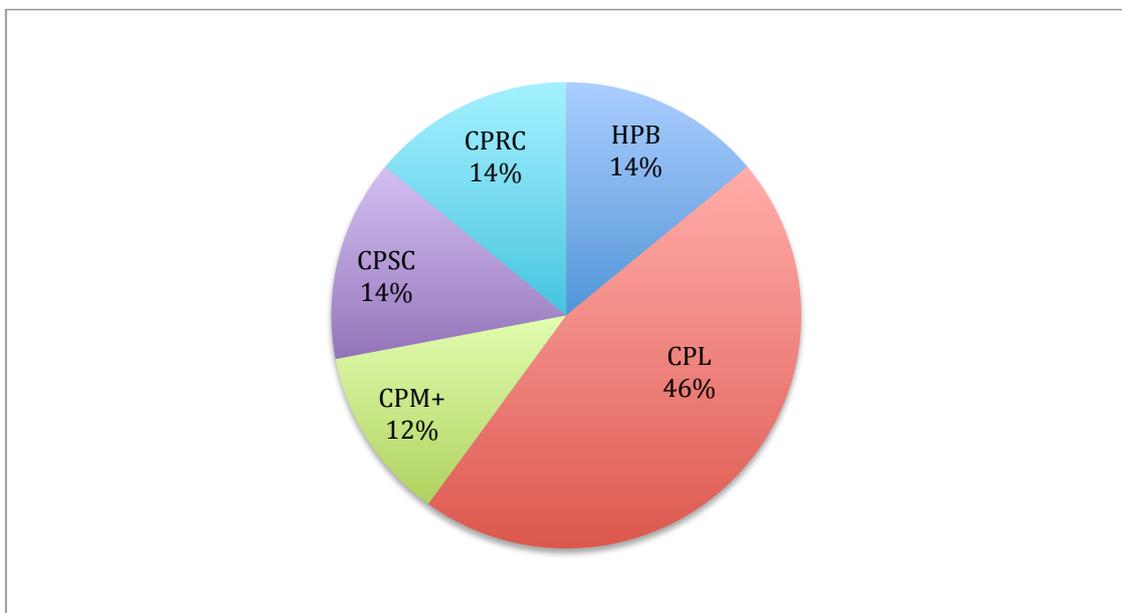
## *5.Resultados*

---



## 5.1 CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS.

Finalmente, se recogieron 88 muestras de 50 pacientes de los cuales 7 fueron intervenidos por HBP (5 mediante RTUp y 2 a través de adenomectomía retropúbica tipo Millin). Los 43 restantes fueron pacientes con tumores de próstata sometidos a biopsia transrectal. De ellos, hubo 6 tumores metastásicos (CPM+) que aún no habían recibido tratamiento en el momento de la biopsia, 7 pacientes con TDA en fase de sensibilidad a la castración (CPSC), 7 pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) y 23 pacientes con tumores localizados (CPL).



**Figura 10. Distribución de los pacientes por tipo de caso.** HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CRPC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

De los 23 pacientes con CPL, se obtuvieron un total de 61 muestras. Estudiamos 10 casos con tumores múltiples, en los que se recogió un cilindro de cada tumor (tejido tumor 1, tejido tumor 2). Además, en 17 casos se recogieron muestras de tejido normal: a) 11 casos en los que se obtuvo de dos zonas sanas, una de tejido normal cercano y otra de tejido normal lejano al tumor; b) en 2 casos solo procedente de tejido normal cercano; y c) en 4 casos solo de tejido normal lejano al tumor.

La media de edad de los pacientes fue de 69,4 años, con una desviación estándar (ds) de 7,64 (intervalo: 54-89 años). La edad media según el grupo se representa en la tabla 7. Los pacientes de mayor edad correspondieron a los grupos de tumores metastásicos con tratamiento, sensibles y resistentes a la castración.

**Tabla 7. Distribución de la edad media de los pacientes por tipo de patología.** HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL; Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración. Mín.: mínimo; máx.: máximo.

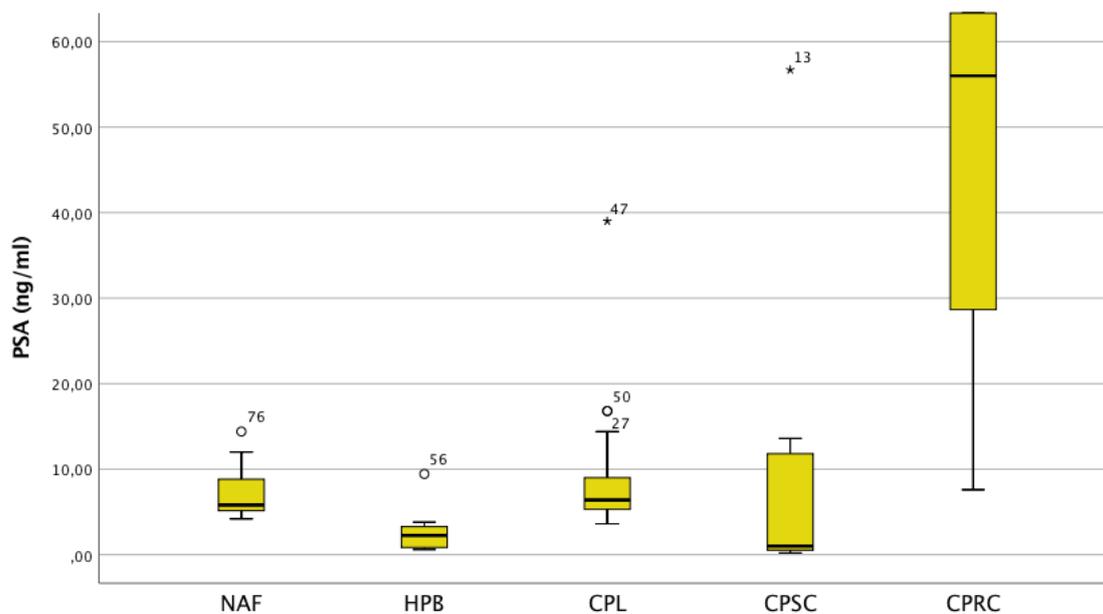
	<b>Edad media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Mín-Máx</b>
HBP	72	9,38083	56-86
CPL	66,9	6,56768	54- 81
CPM+	70,3	11,55278	55-89
CPSC	78,85	5,11301	73-89
CPRC	74,5	10,21204	60-87

Respecto al volumen prostático, el mayor lo presentaron los pacientes con HBP, seguido de los tumores metastásicos. Por el contrario, el menor volumen apareció en aquellos pacientes con tumores localizados.

**Tabla 8. Mediana del volumen prostático por grupos.** HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CLP: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; Min: mínimo; Máx: máximo.

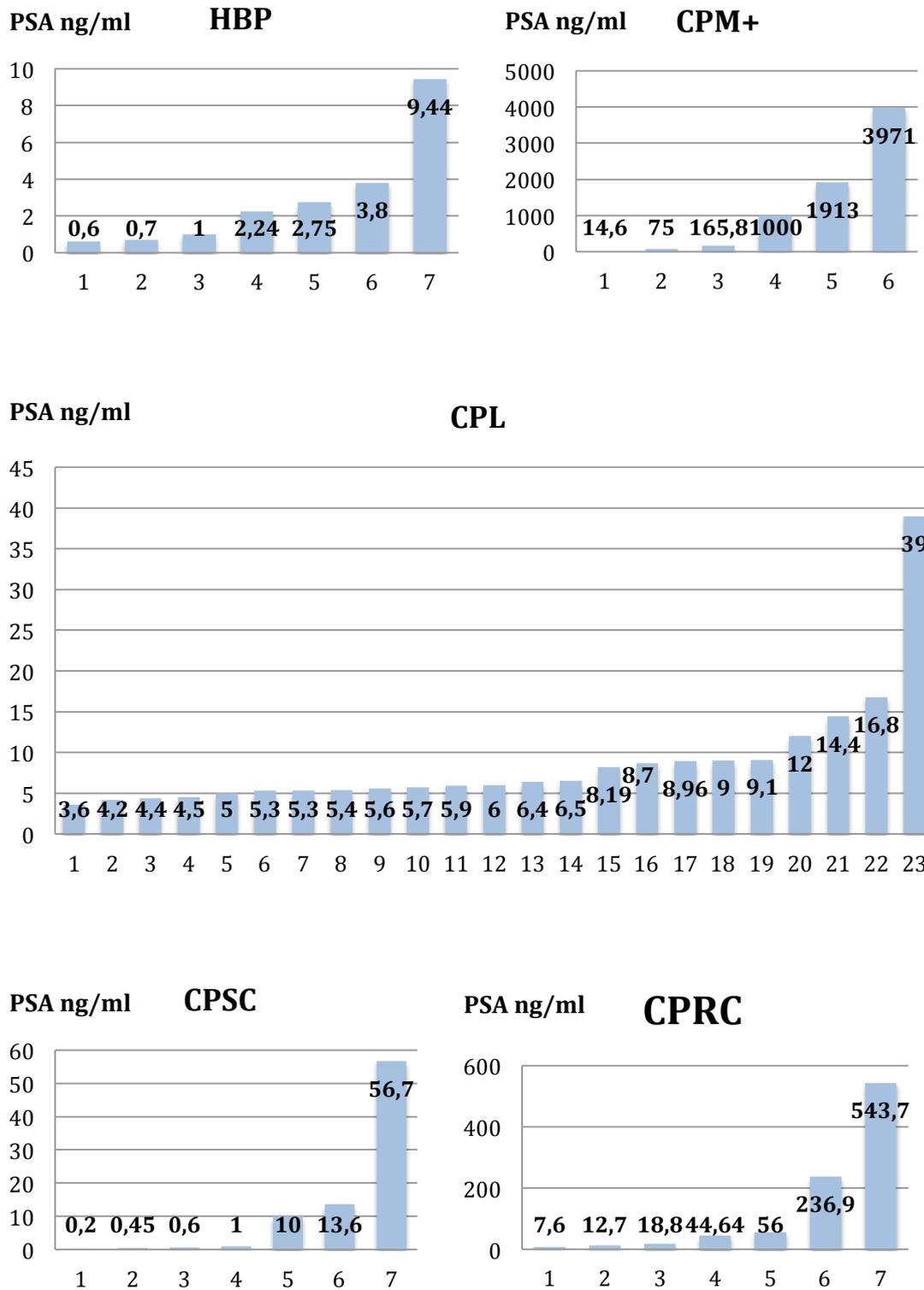
	<b>Mediana</b>	<b>Min-Máx</b>
HBP	40	15-200
CPL	27,5	14-70
CPM+	36,9	29-90
CPSC	38	20-96
CPRC	25	11-65

Los valores de PSA de esta serie de pacientes oscilaron entre 0,2 y 3971 ng/ml. Se expresa en los siguientes gráficos la distribución de PSA según el tipo de caso. En el primer gráfico se ha excluido el grupo CPM+ por presentar unos valores muy elevados que distorsionan la figura.



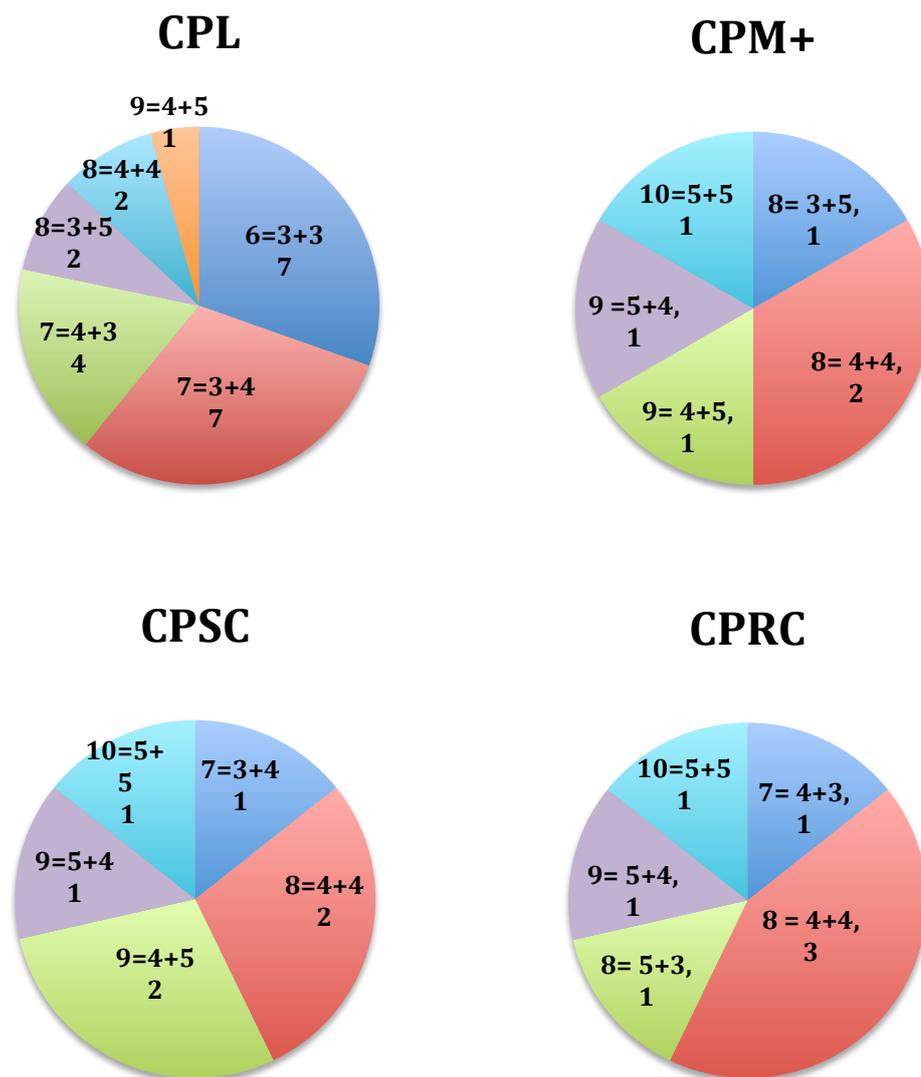
**Figura 11. Valores de PSA según tipo de patología.** NAF: Fibroblastos de tejido normal; HPB: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

Como se puede observar, los valores de PSA difieren enormemente según el grupo al que pertenezcan, por ello, en la Figura 11 se representan los valores de cada paciente dentro de cada grupo.



**Figura 12. Valores de PSA por tipo de patología.** Se expresan las cifras individuales de cada paciente por grupos. A) HBP; Hiperplasia benigna de próstata. B) CPM+; Cáncer de próstata metastásico. C) CPL; Cáncer de próstata localizado. D) CPSC; Cáncer de próstata sensible a la castración. E) CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

Las muestras obtenidas mediante biopsia de próstata transrectal de todos los pacientes con CaP, se clasificaron según la suma de Gleason. La mayoría de los pacientes presentaron una suma de Gleason de 7 y de 8, representados por trece pacientes cada uno. La suma de Gleason menos frecuente fue el 10, con tres casos, todos ellos metastásicos. Los tumores localizados presentaron las sumas de Gleason más bajas con siete casos de Gleason 6 y once casos de Gleason 7. En la figura 12 y en la tabla 9 se representan las sumas de Gleason según los grupos.



**Figura 13. Suma de Gleason de biopsia prostática por grupos de pacientes con CaP.** CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración. En cada sector aparece grado de Gleason y en la línea inferior, el número de pacientes.

**Tabla 9. Suma de Gleason de biopsia prostática por grupos de pacientes con CaP.** CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

<b>CPL</b>	7 Suma de Gleason 6	Siete (3+3)
	11 Suma de Gleason 7	Siete (3+4) Cuatro (4+3)
	4 Suma de Gleason 8	Dos (3+5) Dos (4+4)
	1 Suma de Gleason 9	Uno (4+5)
<b>CPM+</b>	3 Suma de Gleason 8	Uno (3+5) Dos (4+4)
	2 Suma de Gleason 9	Uno (4+5) Uno (5+4)
	1 Suma de Gleason 10	Uno (5+5)
<b>CPSC</b>	1 Suma de Gleason 7	Uno (3+4)
	2 Suma de Gleason 8	Dos (4+4)
	3 Suma de Gleason 9	Dos (4+5) Uno (5+4)
	1 Suma de Gleason 10	Uno (5+5)
<b>CPRC</b>	1 Suma de Gleason 7	Uno (4+3)
	4 Suma de Gleason 8	Tres (4+4) Uno (5+3)
	1 Suma de Gleason 9	Uno (5+4)
	1 Suma de Gleason 10	Uno (5+5)

De los 23 pacientes con tumores localizados, 21 se sometieron a PR como tratamiento primario. Únicamente dos pacientes recibieron RT de inicio. En los 21 casos tratados con cirugía, se comparó la suma de Gleason de la biopsia con la de la pieza de PR obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla 10. Correlación de la suma de Gleason entre biopsia de próstata y pieza de prostatectomía radical.** PR: Prostatectomía radical.

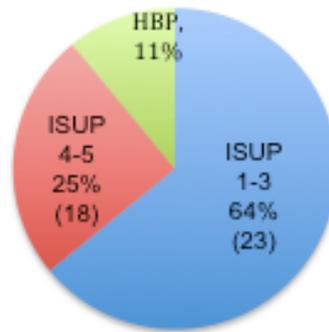
Suma de Gleason PR	3+3	3+4	3+5	4+3	4+5
Suma de Gleason biopsia transrectal	3+3	3	2	2	
	3+4	2	3	1	1
	3+5			1	1
	4+3		1		3
	4+5	1			

Como se puede observar, hubo 7 casos infraestadificados por biopsia y cuatro sobreestadificados. Finalmente, empleamos la suma de Gleason de la pieza de prostatectomía en los casos en los que se realizó (en la mayoría). En el resto de casos se tomó la suma de Gleason de la biopsia prostática. Para realizar los análisis estadísticos empleamos la clasificación ISUP (76).

**Tabla 11. Grupo ISUP.** Grupo 1: Gleason 6 (3+3), Grupo 2: Gleason 7 (3+4), Grupo 3: Gleason 7 (4+3), Grupo 4: Gleason 8 (3+5, 4+4 ó 5+3) y grupo 5: Gleason 9-10 (4+5, 5+4 ó 5+5). PR: Prostatectomía radical; RT: Radioterapia; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; TDA: Cáncer de próstata en tratamiento con deprivación androgénica, tanto sensible como resistente a la castración; RTU: Resección transuretral de próstata; Millin: Adenomectomía de próstata tipo Millin; ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica; HBP: Hiperplasia benigna de próstata. Subrayados en rojo aparecen los pacientes de muy alto riesgo.

ISUP	NO (HBP)	PIEZA	BIOPSIA			RTU/Millin	
		PR	RT	CPM+	TDA	HBP	
						7	7
	1	6					6
	2	6			1		7
	3	4			1		5
	4	4	2	3	6		15
	5	1		3	6		10

Según los criterios de D'Amico, hubo 11 tumores de alto riesgo o localmente avanzados y 12 de bajo/medio riesgo (se agruparon bajo y medio riesgo). Para estudiar los factores estromales, dividimos a los pacientes en grupos, ISUP 1-3 e ISUP 4-5.



**Figura 14. Pacientes agrupados por ISUP para análisis estadísticos.** HBP: Hiperplasia benigna de próstata.; ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica.

En cuanto a los tumores localizados (n=23), la distribución por estadio se llevó a cabo a través de las muestras de PR -pT-, mientras que en los dos casos tratados con RT se empleó la anatomía de la biopsia y la exploración física -cT-. Hubo cinco casos T2a, trece T2c, dos T3a y tres T3b como se refleja en la siguiente tabla.

**Tabla 12. Estadio en tumores localizados** (pT, salvo 2 tratados con RT -cT-). pT: Estadio patológico; cT: Estadio clínico. \* un caso tratado con RT \*\*: un caso tratado con RT + TDA. RT: Radioterapia; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

pT		
	T2a	5
	T2c	12*
	T3a	1**
	T3b	3
Total		23

Respecto al seguimiento, se analiza en función de los grupos de pacientes. Los **CPL** tuvieron una mediana de seguimiento de 58 meses (6-90). Seis pacientes presentaron recidiva bioquímica, tres de cada grupo (bajo/medio vs alto riesgo). En todos los casos se administró RT sobre el lecho. En los **CPM+**, la mediana de seguimiento fue de 26 meses (12-78). Dos de ellos fallecieron a los 15 y 78 meses al hacerse CPRC. En el grupo de **CPSC**, la mediana de seguimiento fue de 38 meses (2-93), con datos de que se hayan hecho CPRC en 3 casos, uno de ellos fallecido. En este grupo, existe el sesgo de seguimientos aún muy breves. En los **CPRC** la mediana de seguimiento fue de 21 meses (20-30), con progresión en al menos 4 casos, sin fallecimientos.

Como se comentó previamente, de los 23 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 realiza un análisis Chi 2 para valorar diferencias significativas entre el tipo de tumor, primario o secundario, y el grado ISUP. Se hace tanto con los 5 grupos ISUP ( $p: 0,899$ ), como agrupándolos en 2 categorías, ISUP 1-3, ISUP 4-5 ( $p: 0,536$ ). No se encuentran diferencias significativas.

A continuación, analizamos la expresión génica de los factores indicados anteriormente en diferentes escenarios, analizando cómo varía su expresión según el tipo de paciente. Para ello empleamos la prueba de Kruskal Wallis (no paramétrica).

## **5.2 CORRELACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES EN LOS FIBROBLASTOS DE DIFERENTES POBLACIONES.**

### **5.2.1. Correlaciones en la expresión génica de los factores expresados por los NAF**

Si aplicamos el coeficiente de correlación de Spearman, observamos multitud de correlaciones estadísticamente significativas entre las expresiones génicas de los diferentes factores por los fibroblastos del tejido normal. Se

representan todas ellas en las tablas 13 y 14, distribuidas de este modo por imposibilidad de representar todas las correlaciones en una única tabla.

**Tabla 13. Correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión génica de los diferentes factores por los NAF.** RA: Receptor androgénico; CDH11: Cadherina 11; CXCL12: Factor derivado de célula estromal-1; CXCL14: C-X-C Ligando de quimioquina 14; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; IL-6: Interleuquina 6; IL-17RB: Receptor B de Interleuquina 17; MMP-9: Metaloproteínasa 9; MMP-11: Metaloproteínasa 11; NFκβ: Factor nuclear kappa subunidad 1; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante B1. En rojo aparecen señaladas las más representativas por estar más cerca de 1 ó -1.

	RA	CDH11	CXCL12	CXCL14	FAP	FGF7	FGF10	HGF	
CXCL14		0,41 p=,029							CXCL14
FGF10	0,40 p=,036	0,65 p<,001		0,44 p=,019					FGF10
HGF	0,55 p=,002	0,44 p=,020	0,38 p=,044				0,41 p=,027		HGF
HSF-1	0,55 p=,002								HSF-1
HSPA1A	0,66 p<,001				0,40 p=,033				HSPA1A
IL-6	-0,66 p=,013					0,79 p=,006	-0,79 p=,001		IL-6
IL-17RB						-0,65 p=,011	0,60 p=,001		IL-17RB
MMP-9		0,50 p=,007		0,54 p=,003		-0,58 p=,030	0,81 p=,001		MMP-9
MMP-11		-0,46 p=,025			0,45 p=,027	0,57 p=,034	-0,70 p<,001		MMP-11
NFκβ	0,53 p=,004					0,58 p=,028		0,50 p=,007	NFκβ
NUDT6	0,49 p=,008		0,45 p=,017				0,60 p=,001		NUDT6
STAT3	0,41 p=,030	0,49 p=,007		0,61 p<,001	0,56 p=,002		0,50 p=,007	0,45 p=,017	STAT3
TGFβ1		0,65 p<,001		0,66 p<,001			0,50 p=,007		TGFβ1

**Tabla 14. Correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión génica de los diferentes factores por los NAF II.** En cada celda aparece el coeficiente de correlación de Spearman seguido de la significación estadística. HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; IL-6: Interleuquina 6; IL-17RB: Receptor B de Interleuquina 17; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-9: Metaloproteínasa 9; MMP-11: Metaloproteínasa 11; PDGFβ: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, subunidad b; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; NFκβ: Factor nuclear kappa subunidad 1; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante B1. En rojo aparecen señaladas las más representativas por estar más cerca de 1 ó -1.

	HSF-1	HSPA1A	IL-6	IL-17RB	MMP-2	MMP-9	MMP-11	PDGFβ	
FAP	0,67 p<,001								FAP
FGF7		-0,60 p=,033			0,68 p=,009				FGF7
HGF	0,54 p=,003	0,38 p=,046							HGF
HSF-1		0,51 p=,005							HSF-1
IL-17RB	0,43 p=,022	0,45 p=,016	-0,56 p=,002						IL-17RB
MMP-2		0,55 p=,002	0,69 p=,009	-0,56 p=,002					MMP-2
MMP-9			-0,69 p=,008	0,62 p<,001					MMP-9
MMP-11				-0,61 p=,002	0,46 p=,022	-0,53 p=,008			MMP-11
NFκβ				-0,49 p=,008	0,55 p=,002		0,49 p=,014		NFκβ
NUDT6			-0,70 p=,007			0,57 p=,002	-0,48 p=,016		NUDT6
STAT3						0,58 p=,001		0,49 p=,016	STAT3
TGFβ1				0,42 p=,024		0,49 p=,008	-0,53 p=,008		TGFβ1

Las correlaciones positivas más significativas son: RA con HSPA1A (0,66;  $p < 0,001$ ), CDH11 con FGF10 (0,65;  $p < 0,001$ ), CDH11 con TGF $\beta$ 1 (0,65;  $p < 0,001$ ), CXCL14 con TGF $\beta$ 1 (0,66;  $p < 0,001$ ), FGF7 con IL-6 (0,79;  $p = 0,006$ ), FGF10 con MMP-9 (0,81;  $p = 0,001$ ), HSF1 con FAP (0,67;  $p < 0,001$ ), IL-6 con MMP-2 (0,69;  $p = 0,009$ ) y MMP-2 con FGF7 (0,68;  $p = 0,009$ ).

Por el contrario, las correlaciones negativas más significativas son las que se enumeran a continuación. RA con IL-6 (-0,66;  $p = 0,013$ ), FGF10 con IL-6 (-0,79;  $p = 0,001$ ), FGF10 con MMP-11 (-0,70;  $p < 0,001$ ), IL-6 con MMP-9 (-0,69;  $p = 0,008$ ) e IL-6 con NUDT6 (-0,70;  $p = 0,007$ ).

### **5.2.2. Correlaciones en la expresión génica de los factores expresados por los CAF**

Al analizar las correlaciones entre los marcadores de este grupo de pacientes a través del coeficiente de Spearman, encontramos múltiples resultados significativos que se representan en la tabla 15.

Las correlaciones positivas más representativas son: RA con NUDT6 (0,60;  $p < 0,001$ ), CDH11 con STAT3 (0,66;  $p < 0,001$ ), FGF10 con IL-17RB (0,66  $p < 0,001$ ), FGF10 con NUDT6 (0,60;  $p < 0,001$ ), HSF-1 con HSPA1A (0,80;  $p < 0,001$ ), MMP-11 con HSPA1A (0,57;  $p < 0,001$ ), NUDT6 con HSPA1A (0,64;  $p < 0,001$ ). En cuanto a las correlaciones negativas, la más representativa es la de RA con FAP (-0,60;  $p < 0,001$ ).

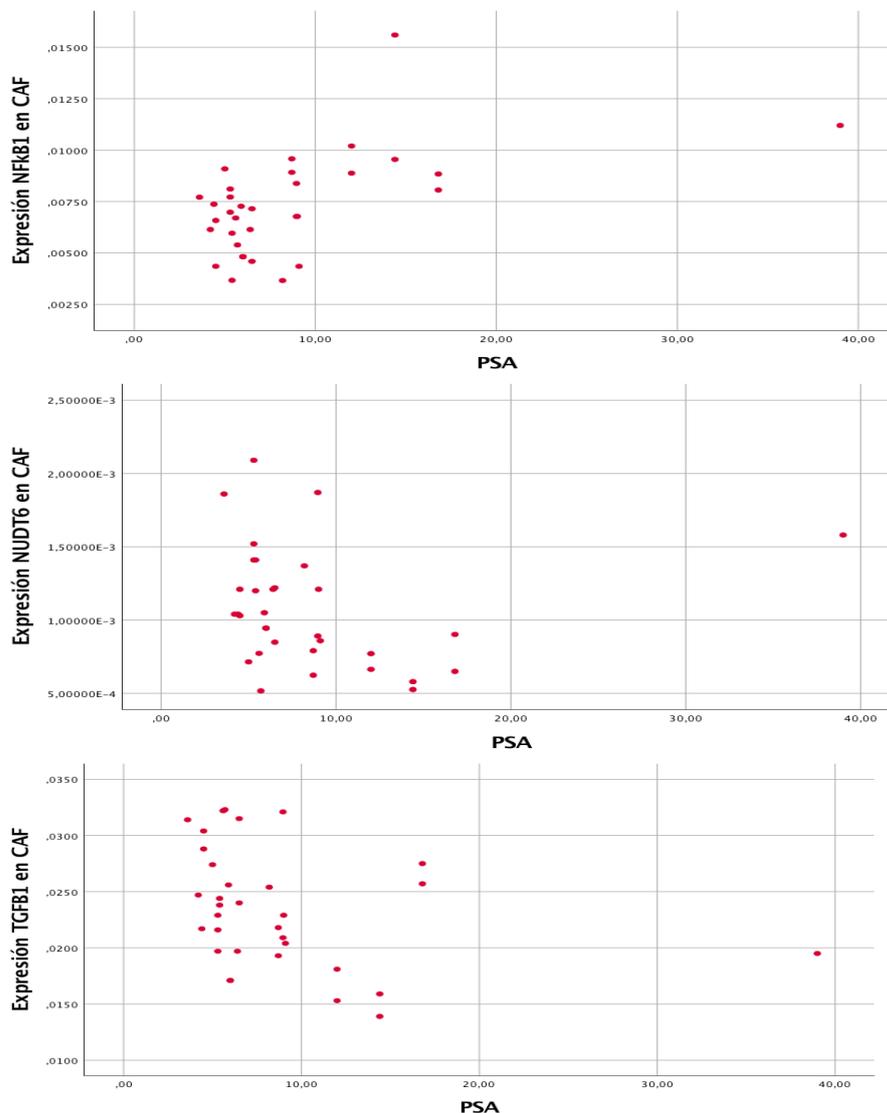
**Tabla 15. Correlación de Spearman entre factores expresados por los CAF.** En cada celda aparece el coeficiente de correlación de Spearman seguido de la significación estadística. RA: Receptor androgénico; CDH11: Cadherina 11; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-11: Metaloproteínasa 11; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante B1; CXCL12: Factor derivado de célula estromal-1; CXCL14: C-X-C-Ligando de quimioquina 14; FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; HSPA1A: Proteína de shock térmico; IL-6: Interleuquina 6; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; MMP-9: Metaloproteínasa 9; NFκβ: Factor nuclear kappa subunidad 1. En rojo aparecen representadas las que son más relevantes por estar más cerca de 1 ó -1.

	RA	CDH11	FAP	FGF10	HGF	HSF-1	MMP-2	MMP-11	NUDT6	STAT3	TGFβ1
CDH11	-0,28 p=,044										
CXCL12	0,35 p=,011			0,29 p=,035							
CXCL14										0,47 p<,001	
FAP	-0,60 p<,001	0,35 p=,011									
FGF7							0,40 p=,004				
FGF10	0,32 p=,021										
HGF		0,55 p<,001	0,33 p=,015								
HSF-1	0,48 p<,001		-0,38 p=,006					0,54 p<,001			
HSPA1A			-0,51 p<,001	0,31 p=,022		0,80 p<,001		0,57 p<,001	0,64 p<,001	0,29 p=,034	
IL-6		0,42 p=,003					0,35 p=,016			0,48 p=,001	0,46 p=,001
IL-17RB				0,66 p<,001			-0,29 p=,050				
MMP-2		0,32 p=,018		-0,33 p=,016							
MMP-9		0,33 p=,023	0,34 p=,020		0,43 p=,003						0,29 p=,045
NFκβ			0,44 p=,001	-0,41 p=,003	0,34 p=,013		0,45 p=,001		-0,34 p=,014		-0,36 p=,010
NUDT6	0,60 p<,001		-0,50 p<,001	0,60 p<,001		0,53 p<,001		0,35 p=,014			
PDGFβ								0,39 p=,008		0,43 p=,003	
STAT3		0,66 p<,001	0,31 p=,023		0,44 p=,001		0,39 p=,004	0,30 p=,035			
TGFβ1		0,49 p<,001								0,37 p=,006	

## 5.3 RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CAF Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LOS CPL.

### 5.3.1 Correlaciones de los niveles de expresión génica de los distintos factores por los CAF con PSA

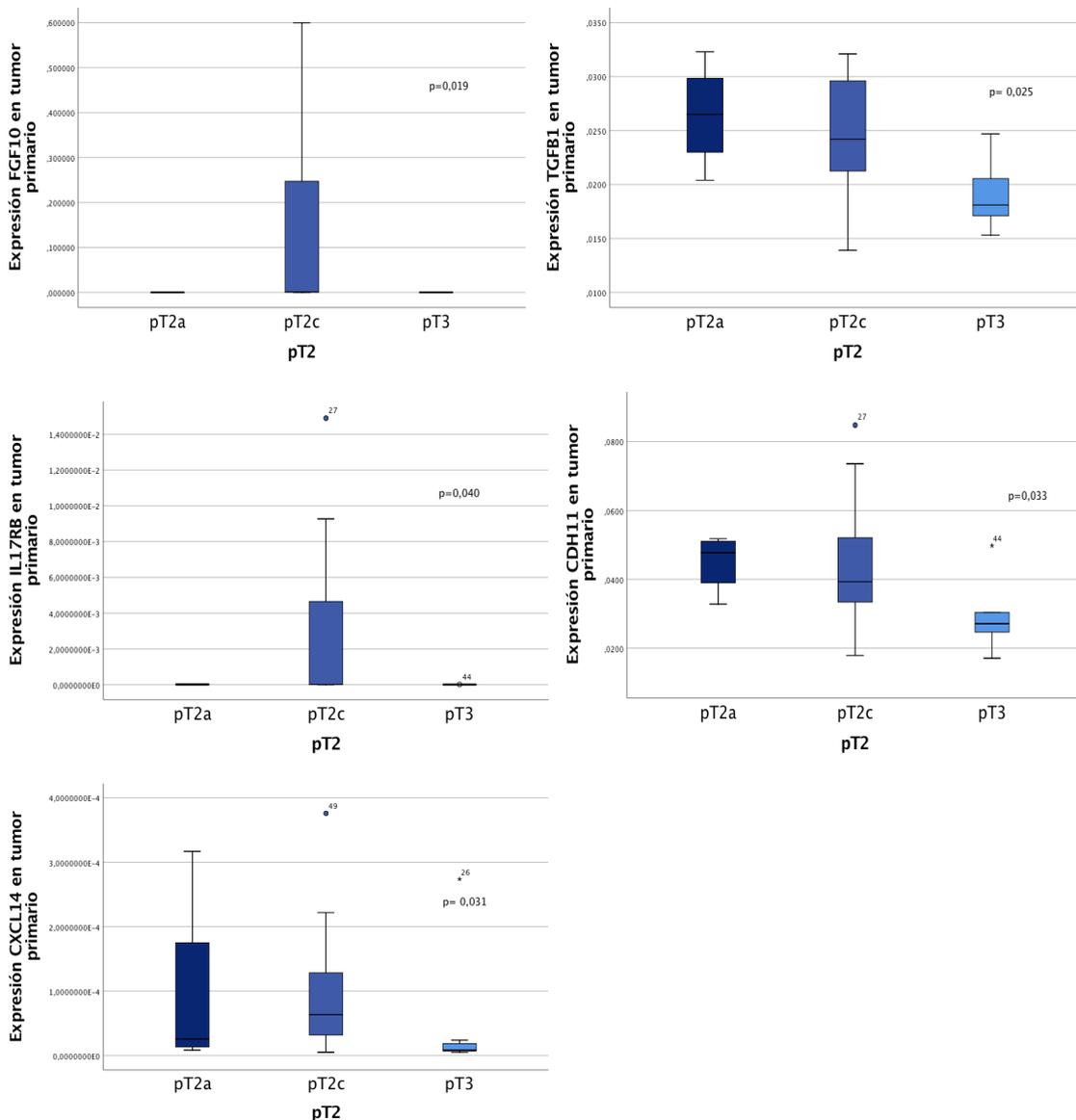
Al estudiar estas correlaciones, únicamente se encontraron resultados significativos en tres de los factores. Una correlación positiva entre PSA y NF $\kappa$ B 0,41 (p=0,017) y dos correlaciones negativas; entre PSA y NUDT6 -0,38 (p=0,028) y entre PSA y TGF $\beta$ -1 -0,39 (p=0,024). Se encuentran representadas en la figura 15.



**Figura 15. Coeficiente de correlación de Spearman entre la expresión génica de los factores por parte de los CAF y los niveles de PSA. NF $\kappa$ B: Factor nuclear kappa subunidad 1; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; TGF $\beta$ -1: Factor de crecimiento transformante B1; CAF: Fibroblastos asociados a cáncer de próstata; PSA: Antígeno prostático específico.**

### 5.3.2 Comparación de la expresión génica de los factores por los CAF de CPL según estadio

Se observaron diferencias significativas clínicamente relevantes según el estadio tumoral en la expresión génica de los siguientes factores: FGF10 (0,019), TGFβ-1 (p= 0,025), IL-17RB (p= 0,040), CDH11 (p= 0,033) y CXCL14 (p=0,031). En los casos de CDH11 y TGFβ-1, se observa una clara tendencia, a mayor estadio tumoral menor expresión del factor. Sin embargo, en el resto de casos, la expresión aumenta en T2 y vuelve a disminuir en T3.



**Figura 16. Boxplot de la expresión génica de los factores estromales expresados por los CAF en función del estadio.** FGF10: Factor de crecimiento 10; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante β1; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; CDH11: Cadherina 11; CXCL14: C-X-C Ligando de quimioquina 14.

### **5.3.3 Expresión génica de factores por los CAF según clasificación ISUP**

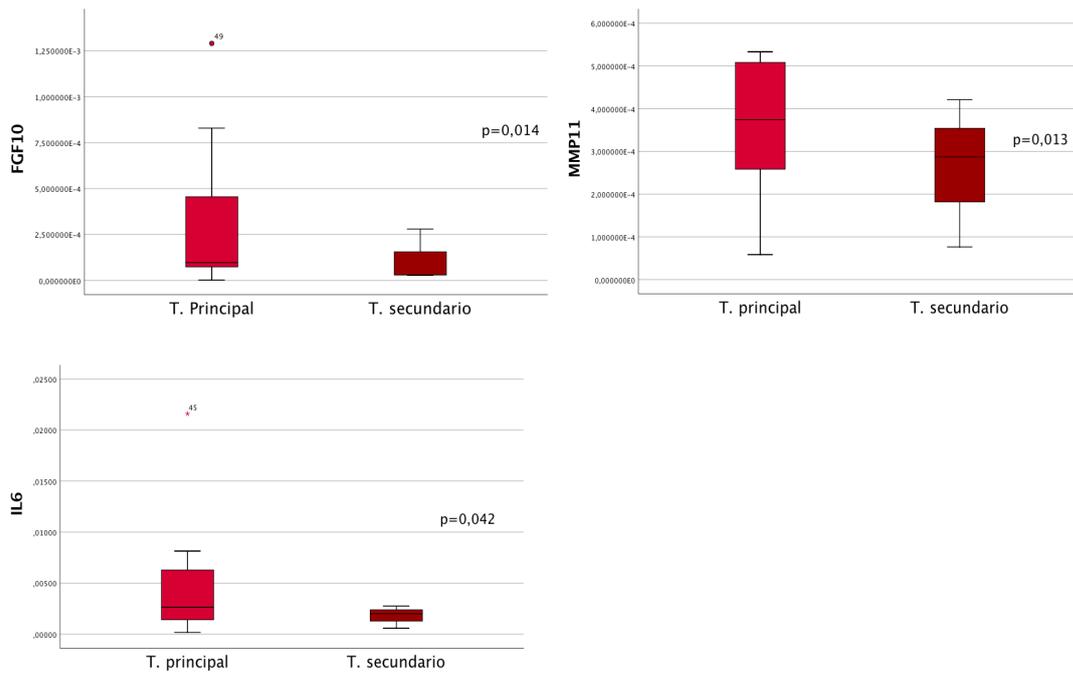
No hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de factores estromales por los CAF en relación a la clasificación ISUP.

## **5.4 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS NAF DE TEJIDO SANO CERCANO Y LEJANO AL TUMOR.**

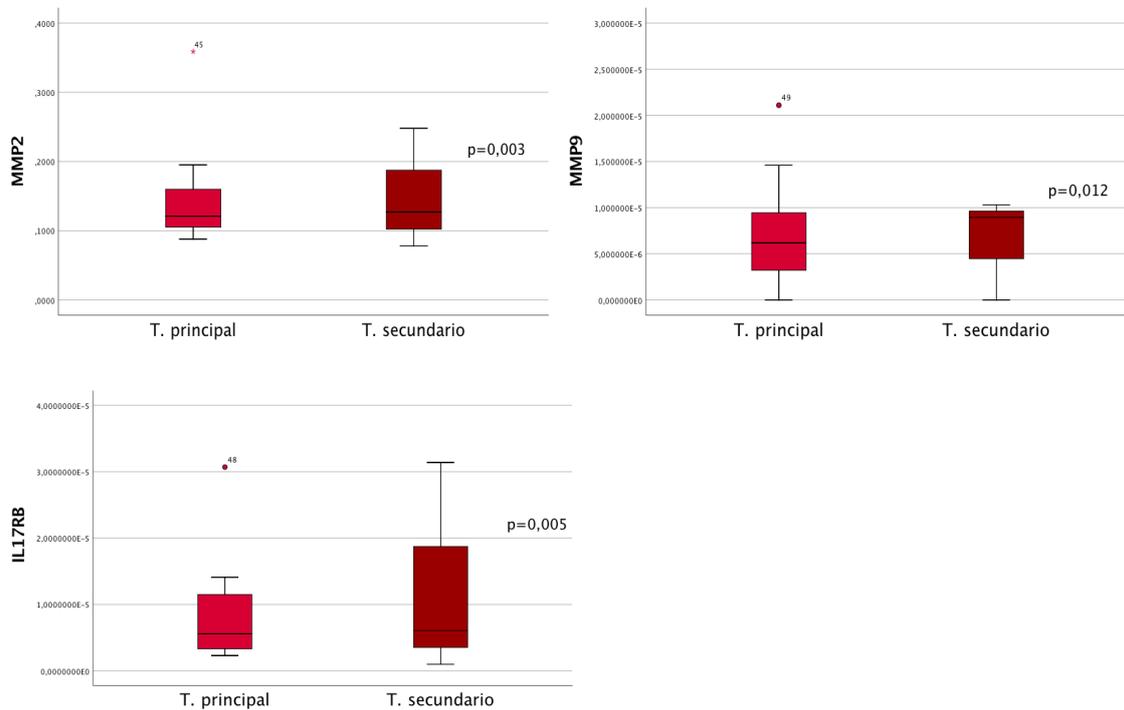
Si comparamos la expresión génica de los factores por los NAF en tejido normal cercano y lejano al tumor, no encontramos diferencias significativas en cuanto a su expresión. A partir de ahora, los NAF estarán representados exclusivamente por las muestras recogidas más lejanas al tumor, evitando así la repetición de muestras de un mismo paciente.

## **5.5 COMPARACIÓN DEL PERFIL GÉNICO DE LOS CAF DE LOS TUMORES PRINCIPALES CON LOS DE LOS FOCOS SECUNDARIOS EN LOS CaP MULTIFOCALES.**

En cuanto al grupo CPL, si en los casos de CaP multifocal comparamos las muestras del tumor principal, considerado éste el más agresivo, con las del tumor secundario, aparecen diferencias significativas en la expresión génica de los siguientes factores: FGF 10 ( $p=0,014$ ), MMP-11 ( $p=0,013$ ) y IL-6 ( $p=0,042$ ) encuentran elevada su expresión en el tumor principal. Por el contrario, MMP-2 ( $p=0,003$ ), MMP-9 ( $p=0,012$ ) y IL-17RB ( $p=0,005$ ) presentan una expresión más elevada en el tumor secundario. A partir de ahora, el perfil génico de los CAF estará representado por la muestra del tumor principal, desechando las de tumor secundario para evitar emplear muestras repetidas del mismo paciente.



**Figura 17. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en el tumor principal en relación con el tumor secundario. FGF10: Factor de crecimiento 10; MMP-11: Metaloproteinasas 11; IL-6: Interleuquina 6.**

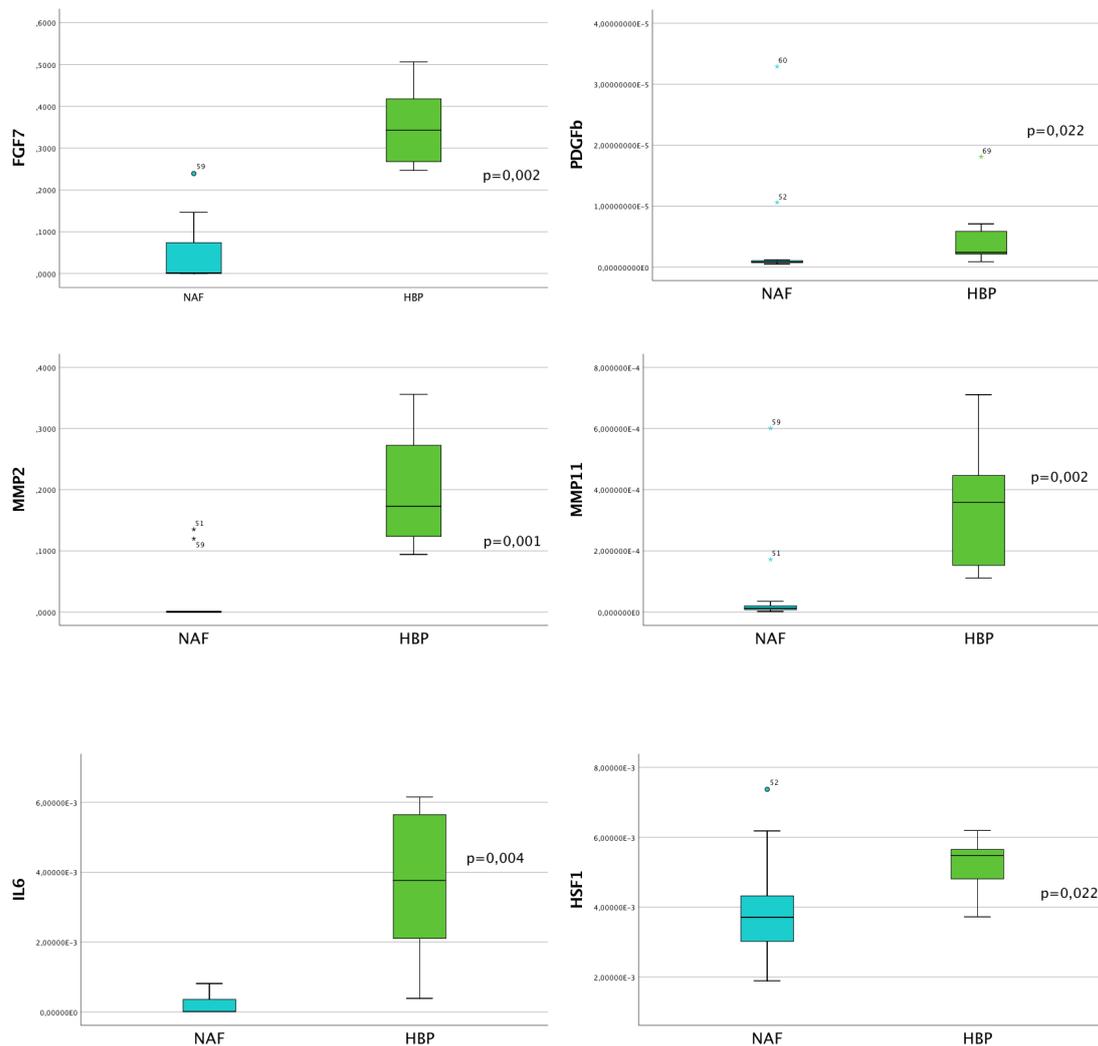


**Figura 18. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en el tumor secundario en relación con el tumor principal. MMP-2: Metaloproteinasas 2; MMP-9: Metaloproteinasas 9; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17.**

## 5.6 EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES EN LOS NAF EN COMPARACIÓN CON FIBROBLASTOS DE HBP Y CAF.

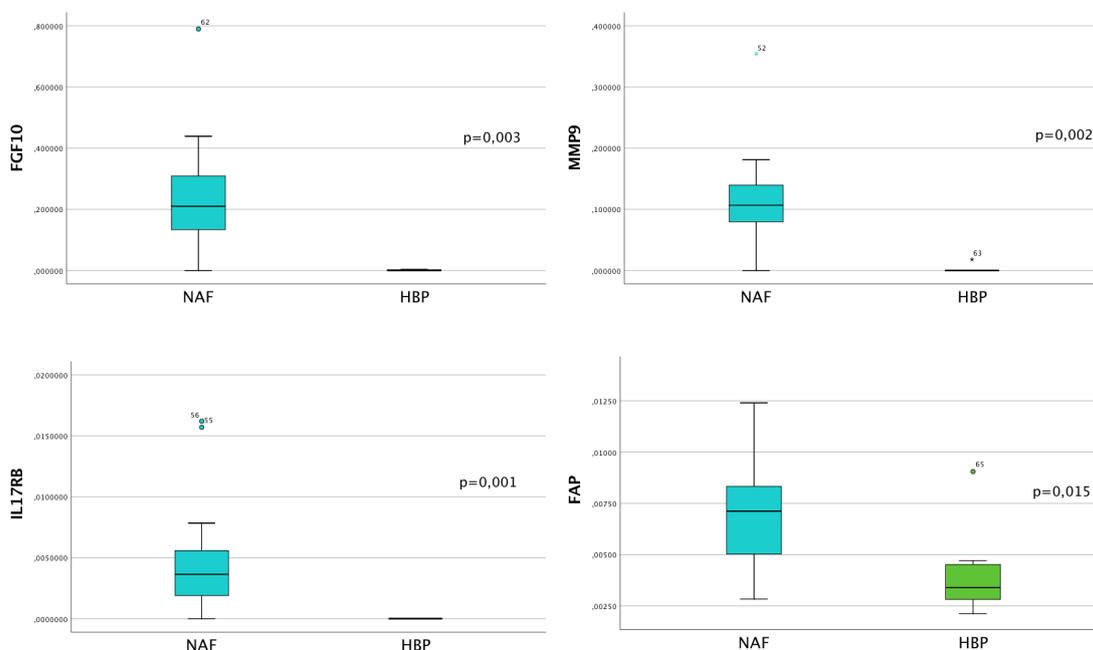
### 5.6.1 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los fibroblastos de HBP

En los fibroblastos de pacientes con HBP aumenta la expresión de FGF7 ( $p=0,002$ ), PDGF $\beta$  ( $p=0,022$ ), MMP-2 ( $p=0,001$ ), MMP-11 ( $p=0,002$ ), IL-6 ( $p=0,004$ ) y HSF-1 ( $p=0,022$ ), en comparación con los NAF.



**Figura 19. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en HBP respecto a los NAF.** FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; PDGF $\beta$ : Factor de crecimiento derivado de plaquetas, subunidad b; MMP-2: Metaloproteinasa 2; MMP-11: Metaloproteinasa 11; IL-6: Interleuquina 6; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata.

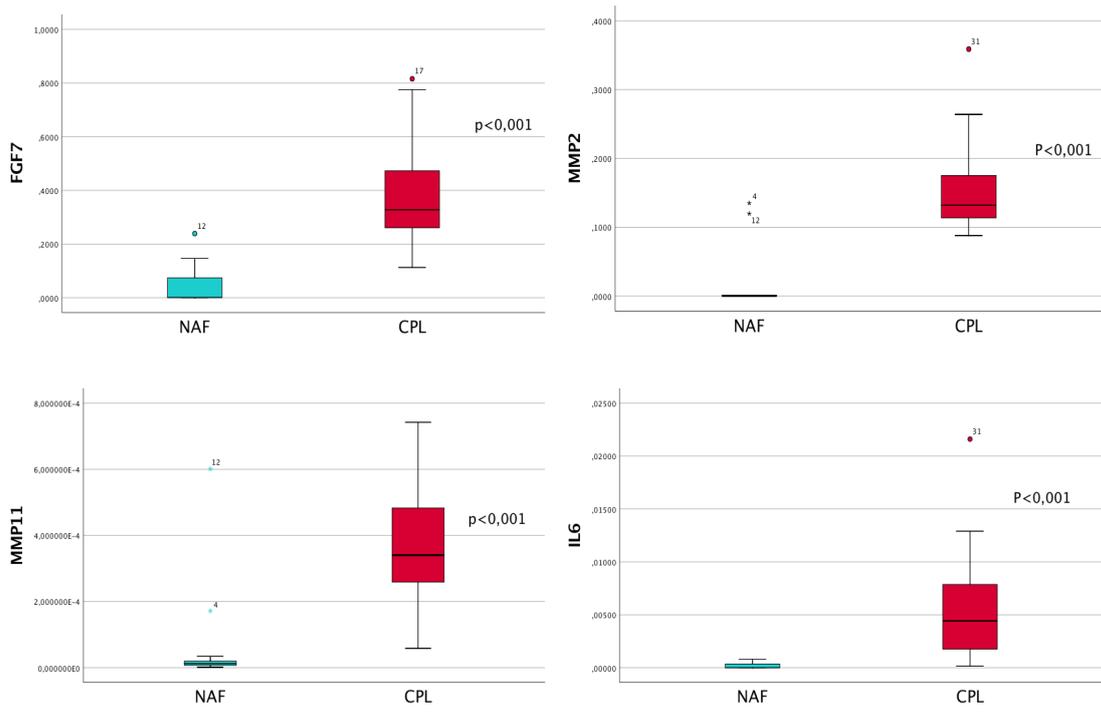
Sin embargo, las expresiones de FGF10 ( $p=0,003$ ), MMP-9 ( $p= 0,002$ ), IL-17RB ( $p= 0,001$ ) y FAP ( $p=0,015$ ) se encuentran disminuidas en los fibroblastos de HBP en comparación con los NAF.



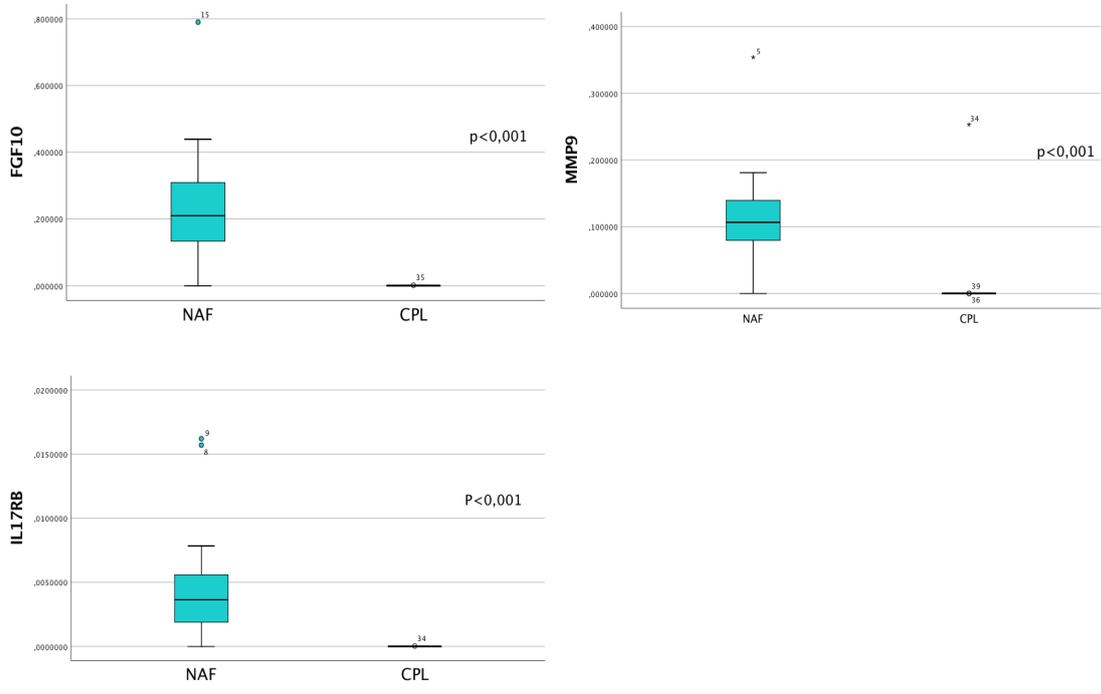
**Figura 20. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en HBP respecto a los NAF.** FGF10: Factor de crecimiento 10; MMP-9: Metaloproteína 9; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata.

### 5.6.2 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de CPL

En pacientes con CPL, los CAF muestran expresiones génicas más elevadas de FGF7 ( $p<0,001$ ), MMP-2 ( $p<0,001$ ), MMP-11 ( $p<0,001$ ) y IL-6 ( $p<0,001$ ) en comparación con los NAF. Por el contrario, presentan menor expresión de FGF10 ( $p<0,001$ ), MMP-9 ( $p<0,001$ ) y IL-17RB ( $p<0,001$ ).



**Figura 21. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de CPL respecto a los NAF** FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-11: Metaloproteínasa 11; IL-6: Interleuquina 6; NAF: Fibroblastos de tejido normal; CPL: Cáncer de próstata localizado.

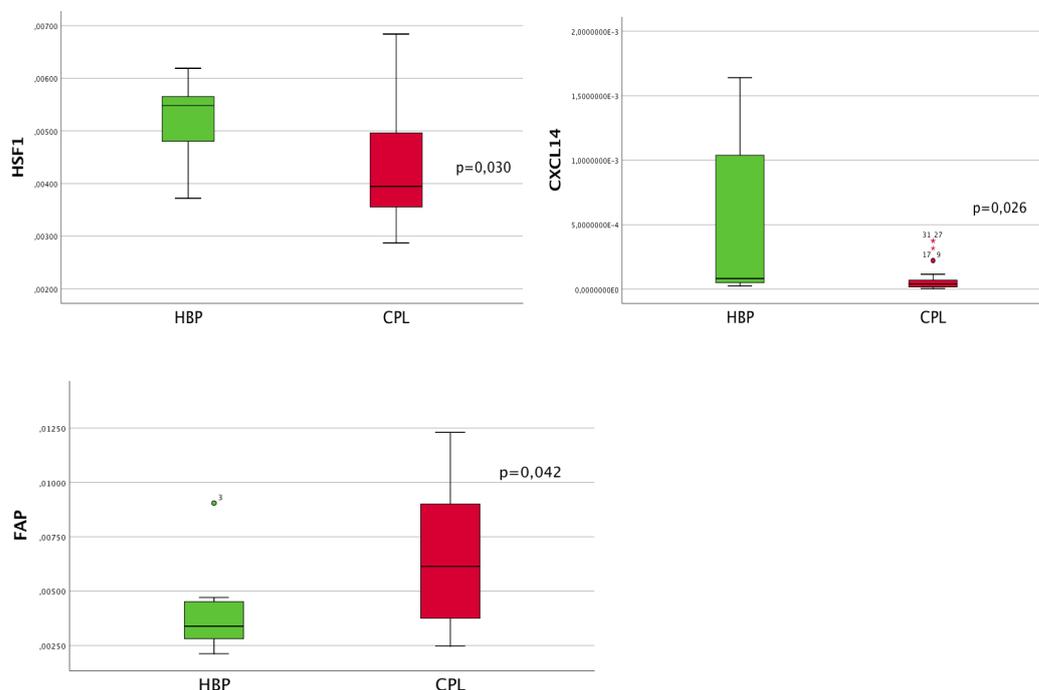


**Figura 22. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de CPL respecto a los NAF** FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; MMP-9: Metaloproteínasa 9; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; NAF: Fibroblastos de tejido normal; CPL: Cáncer de próstata localizado.

Tras estas comparaciones, se puede extraer que FGF7, IL-6, MMP-2 y MMP-11 se encuentran elevados tanto en los fibroblastos de HBP como de CPL con respecto a los NAF. En los fibroblastos de HBP además aumentan PDGF $\beta$  y HSF-1, lo que parece indicar que son factores relacionados con esta patología. Por otro lado, las expresiones de FGF10, MMP-9 y IL-17RB disminuyen en los fibroblastos correspondientes a las dos patologías, estando FAP disminuido en HBP, lo que sugiere que es un factor más relacionado con CPL.

### 5.6.3 Comparación de la expresión génica de factores entre los fibroblastos de HBP y los CAF de CPL

Al comparar estos dos grupos, las expresiones génicas de HSF-1 ( $p=0,030$ ) y CXCL14 ( $p=0,026$ ), aparecen elevadas en los fibroblastos de HBP con respecto a los CAF de CPL. Por el contrario, la expresión de FAP ( $p=0,042$ ) es mayor en el caso de los CAF de CPL que en los fibroblastos de HBP.

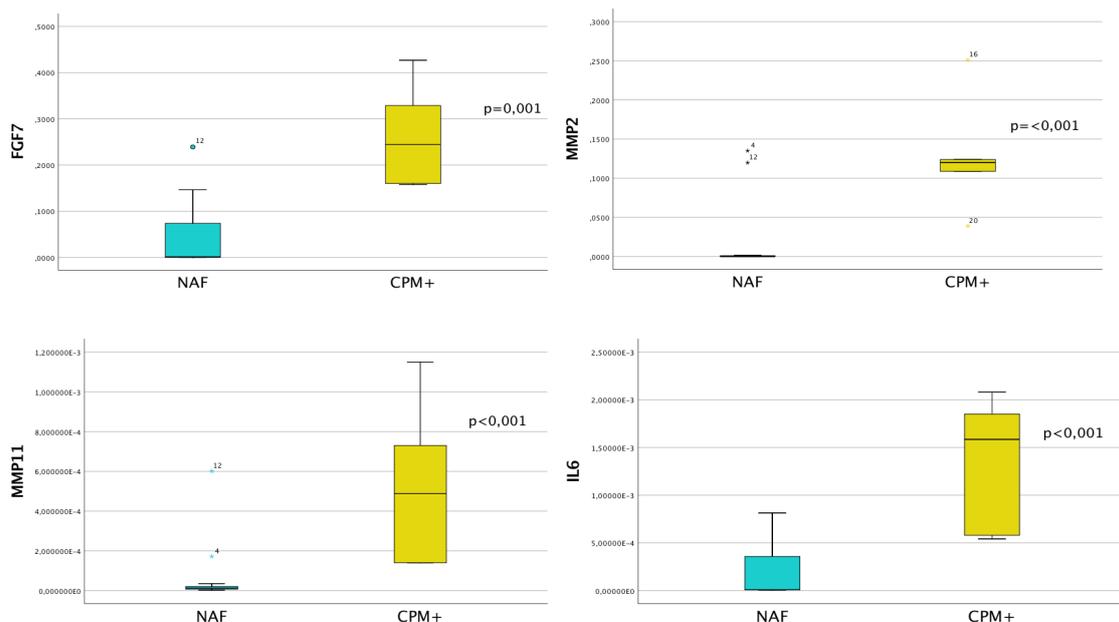


**Figura 23. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores en los fibroblastos de HBP respecto a los CAF de CPL.** HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; CXCL14: C-X-C- Ligando de quimioquina 14; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado.

## 5.7 COMPARACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE LOS NAF Y DE LOS CAF DE CPL CON LOS DE LOS CPM+ Y LOS DE LOS SOMETIDOS A TDA.

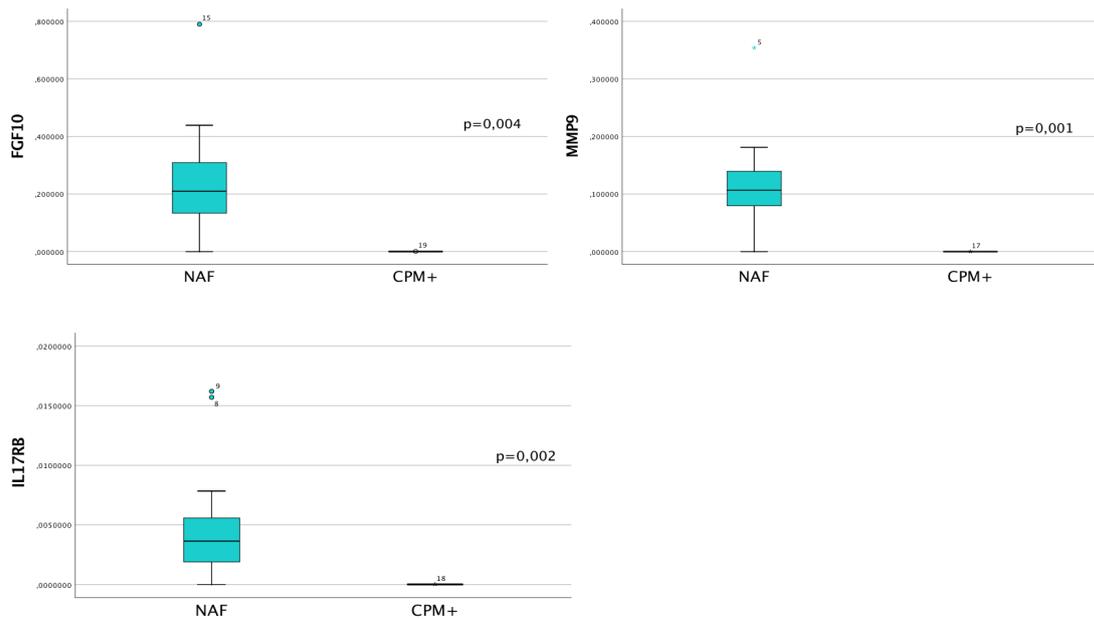
### 5.7.1 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de CPM+

Al realizar esta comparación, observamos que las diferencias en la expresión génica de los factores por parte de los CAF de CPM+ con respecto a los NAF son las mismas que entre los NAF y los CAF de CPL. Se observa una elevación en la expresión génica de FGF7 ( $p=0,001$ ), MMP-2 ( $p<0,001$ ), MMP-11 ( $p<0,001$ ) e IL-6 ( $p<0,001$ ) en los CAF de CPM+ en comparación con los NAF.



**Figura 24. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de CPM+ respecto a los NAF.** FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; MMP-2: Metaloproteína 2; MMP-11: Metaloproteína 11; IL-6: Interleuquina 6; NAF: Fibroblastos de tejido normal; CPM+: Cáncer de próstata metastásico.

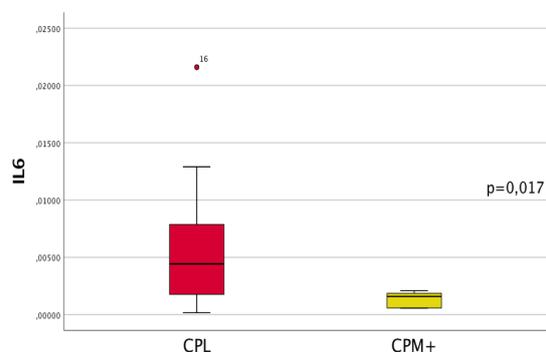
También aparece disminuida la expresión génica de los mismos factores en los CAF de CPM+ que en los de CPL con respecto a los NAF, FGF10 ( $p=0,004$ ), MMP-9 ( $p=0,001$ ) e IL-17RB ( $p=0,002$ ).



**Figura 25. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de CPM+ respecto a los NAF.** FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; MMP-9: Metaloproteínasa 9; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; NAF: Fibroblastos de tejido normal; CPL: Cáncer de próstata localizado.

### 5.7.2 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPL y los CAF de CPM+

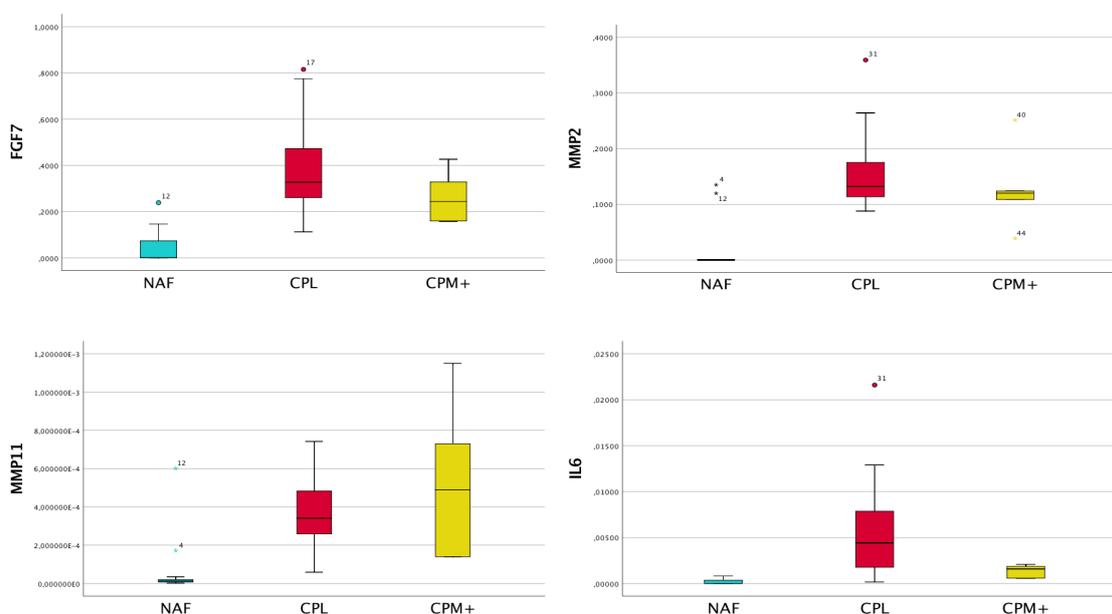
Si comparamos las muestras de pacientes con CPL con las de CPM+ aún sin tratamiento, vemos que la única diferencia significativa en la expresión de los factores por parte de los CAF, es una disminución de IL-6 ( $p=0,038$ ) en CPM+.



**Figura 26. Boxplot comparando la mediana de expresión de IL-6 entre los CAF de CPL y CPM+.** IL-6: Interleuquina 6; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico.

### 5.7.3 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF, los CAF de CPL y los CAF de CPM+

Aunque muchas de estas diferencias no alcanzan la significación estadística, parece interesante observar la diferencia de expresión génica de factores entre estos grupos, así vemos como la expresión de FGF7 está elevada en los CAF de CPL respecto a los NAF así como en los CAF de CPM+ con respecto a los NAF, sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre los CAF de CPL y CPM+. Esto mismo ocurre con la expresión de MMP-2 y MMP-11. En cuanto a IL-6, su expresión de ve aumentada en los CAF de CPL y CPM+ con respecto a los NAF, pero aparece más elevada en los CAF de CPL que en los de CPM+ con diferencias significativas.

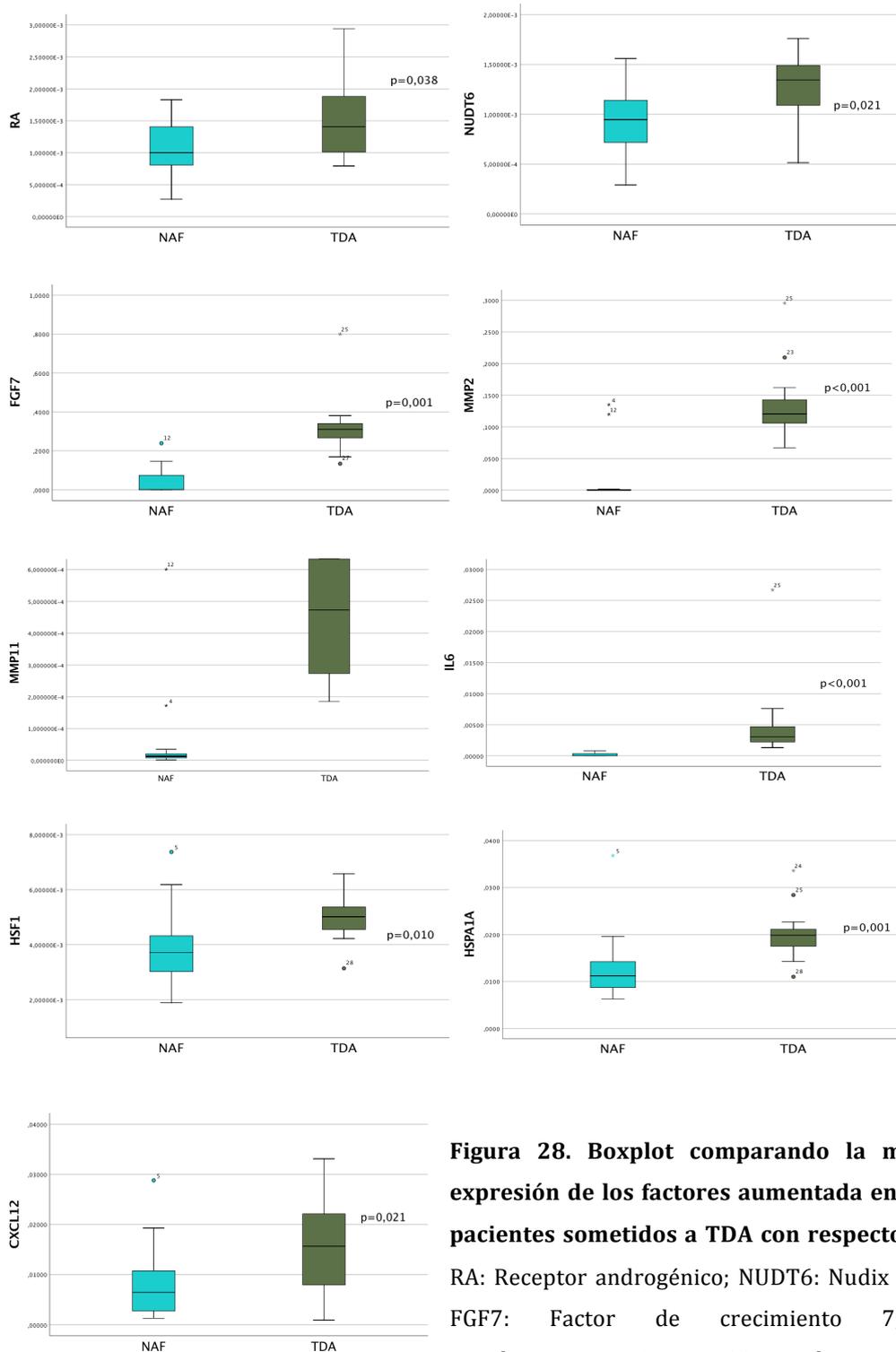


**Figura 27. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores entre los NAF, los CAF de CPL y los CAF de CPM+. FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-11: Metaloproteínasa 11; IL-6: Interleuquina 6; NAF: Fibroblastos de tejido normal; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico.**

### 5.7.4 Comparación de la expresión génica de factores entre los NAF y los CAF de pacientes sometidos a TDA

Al comparar este nuevo grupo constituido por las muestras de todos los pacientes sometidos a tratamiento, tanto CPRC como CPSC al que hemos

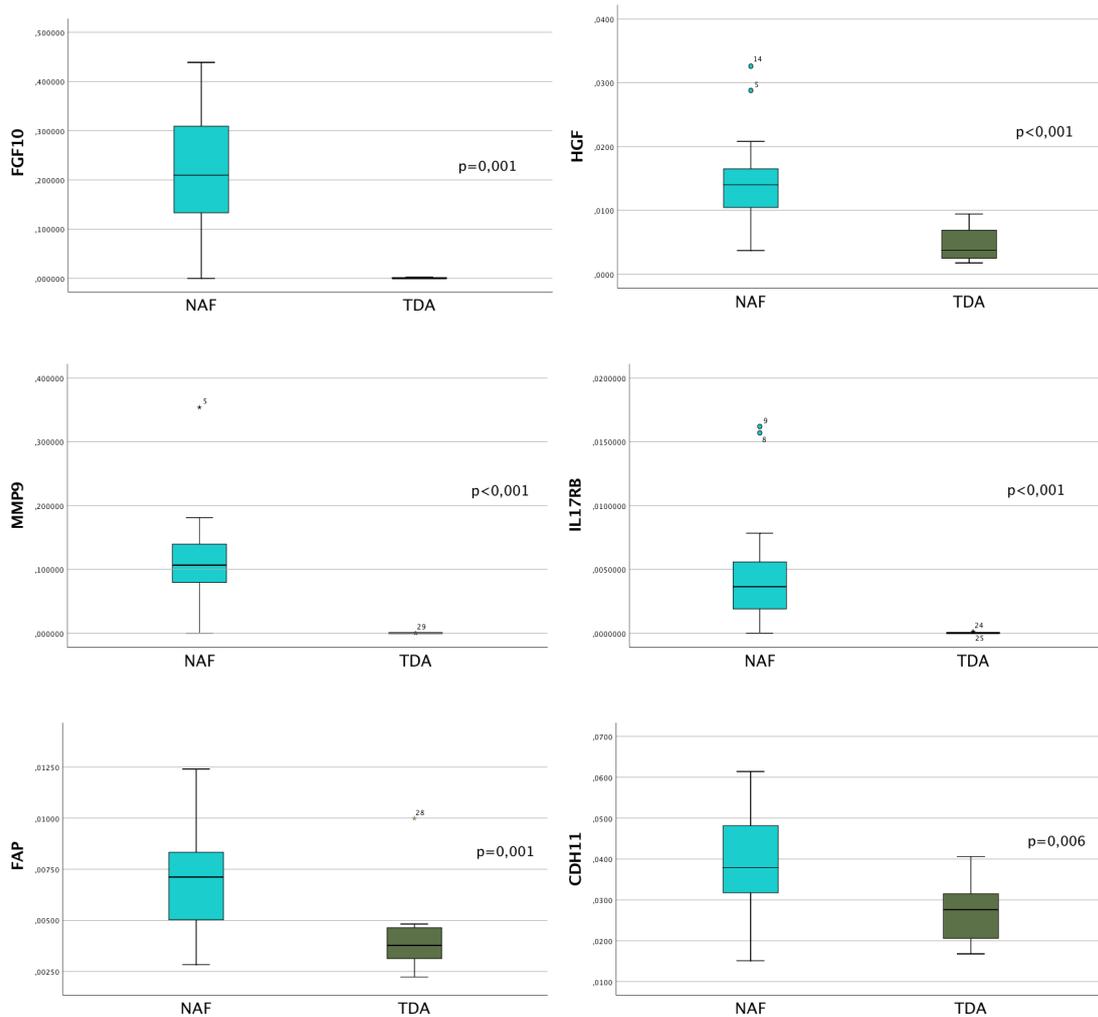
denominado TDA con tejido normal, vemos que existe una diferencia significativa en la expresión génica de multitud de los factores estromales por parte de los fibroblastos.



**Figura 28. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentada en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los NAF.**

RA: Receptor androgénico; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; FGF7: Factor de crecimiento 7; MMP-2: Metaloproteinas 2; MMP-11: Metaloproteinas 11; IL-6: Interleuquina 6; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; CXCL12: Factor derivado de célula estromal-1; NAF: Fibroblastos de tejido normal; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

Como se observa en la figura 28, en los pacientes en tratamiento con TDA, los CAF presentan una mayor expresión de RA ( $p=0,038$ ) en comparación con los NAF. Así mismo aumenta la expresión génica de otros factores por parte de los CAF de TDA como NUDT6 ( $p=0,021$ ), FGF7 ( $p=0,001$ ), MMP-2 ( $p<0,001$ ), MMP-11 ( $p<0,001$ ), IL-6 ( $p<0,001$ ), HFS-1 ( $p=0,010$ ), HSPA1A ( $p=0,001$ ), y CXCL12 ( $p=0,021$ ) con respecto a los NAF.

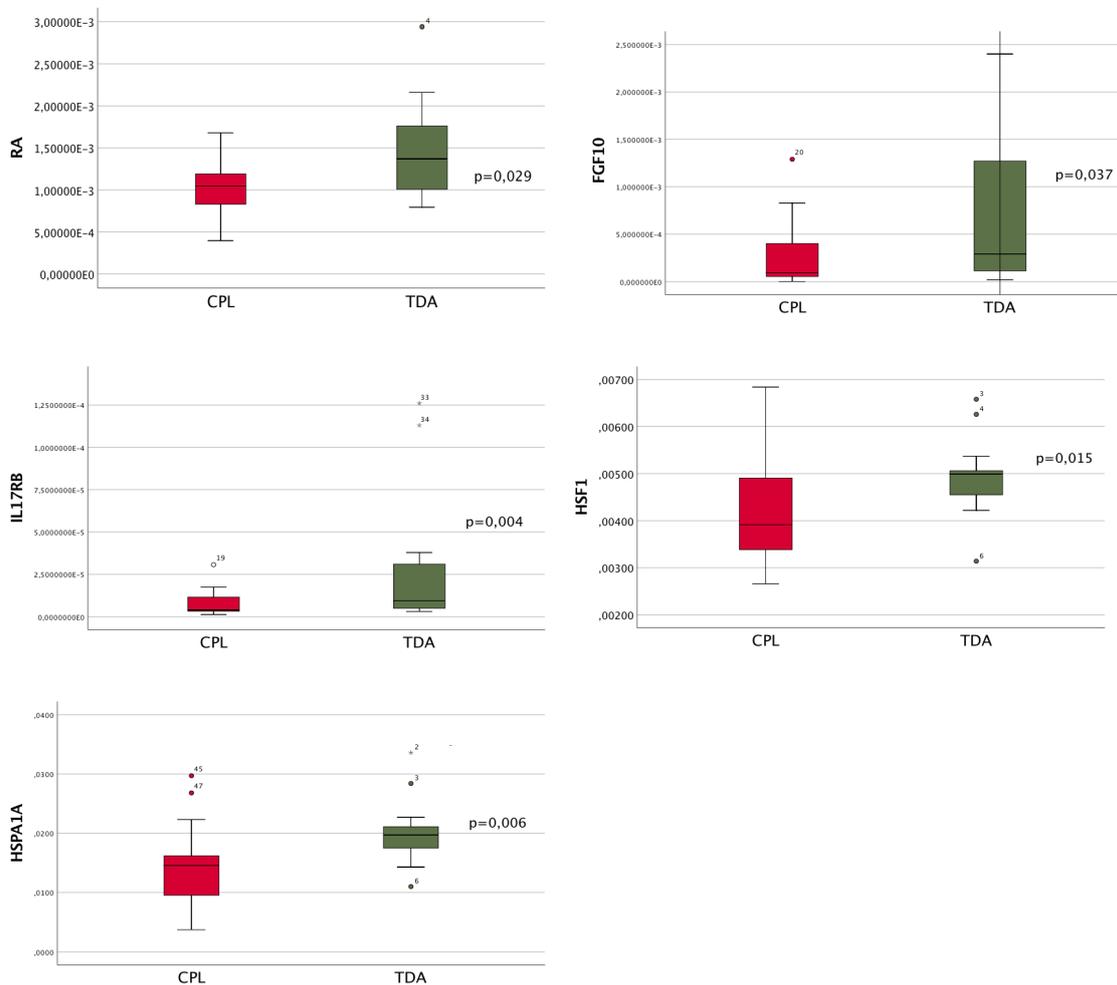


**Figura 29. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuida en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los NAF.** FGF10: Factor de crecimiento 10; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; MMP-9: Metaloproteínasa 9; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; CDH11: Cadherina 11 NAF: Fibroblastos de tejido normal; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

Por el contrario, la expresión de FGF10 ( $p=0,001$ ), HGF ( $p<0,001$ ), MMP-9 ( $p<0,001$ ), IL-17RB ( $p<0,001$ ), FAP ( $p=0,001$ ) y CDH11 ( $p=0,006$ ) se ve disminuida por los CAF de TDA con respecto a los NAF.

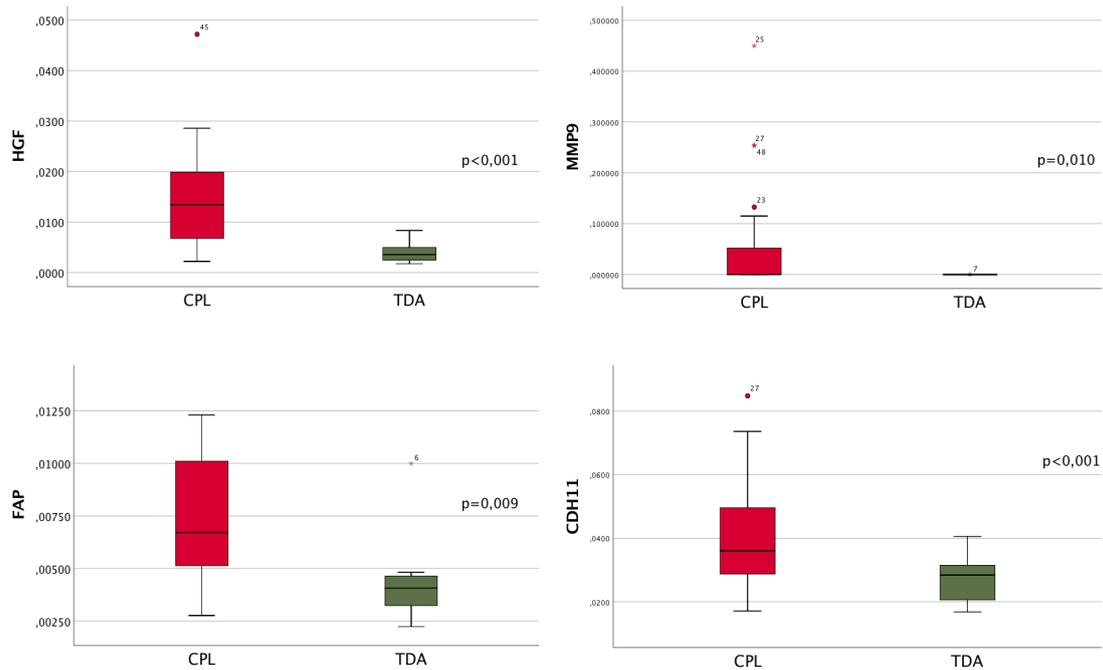
### 5.7.5 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPL y los de pacientes sometidos a TDA

Como se observa en la figura 32, la expresión de RA ( $p=0,029$ ) continúa viéndose aumentada en los CAF de pacientes con TDA. Además se ve un aumento en la expresión de FGF10 ( $p=0,037$ ), IL-17RB ( $p= 0,004$ ), HSF-1 ( $p=0,015$ ) y HSPA1A ( $p=0,006$ ) al compararlo con los CAF de CPL.



**Figura 30. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores aumentados en los CAF de pacientes sometidos a TDA respecto a los CAF de CPL.** RA: Receptor androgénico; FGF10: Factor de crecimiento 10; IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; HSF1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; CPL: Cáncer de próstata localizado; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

También persiste disminuida la expresión los valores de HGF ( $p < 0,001$ ), MMP-9 ( $p = 0,010$ ), FAP ( $p = 0,009$ ) y CDH11 ( $p < 0,001$ ) por parte de los CAF de pacientes sometidos a TDA respecto a los CAF de CPM+. La expresión de MMP-9 es mayor en tumores localizados que en tumores tratados con TDA. Parece que la expresión de MMP-9 disminuye en los CAF si lo comparamos con tejido normal y disminuye aún mas en los CAF de los pacientes en tratamiento con TDA.

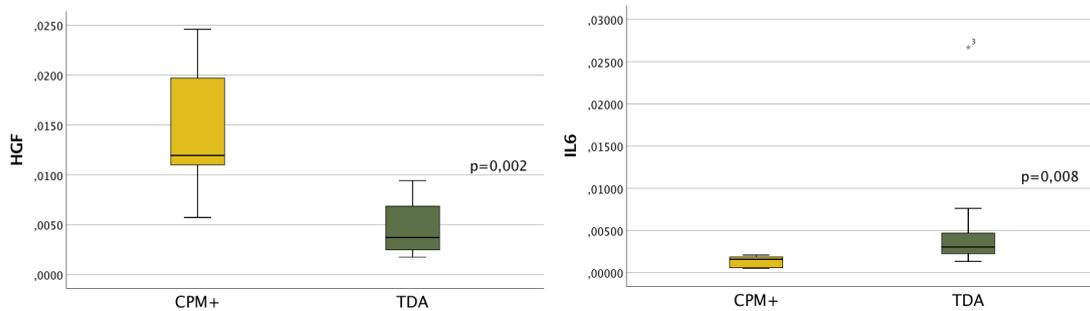


**Figura 31. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores disminuidos en los CAF de pacientes sometidos a TDA con respecto a los CAF de CPL.** HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; MMP-9: Metaloproteinasas 9; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; CDH11: Cadherina 11; CPL: Cáncer de próstata localizado; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

### 5.7.6 Comparación de la expresión génica de factores entre los CAF de CPM+ y los de pacientes sometidos a TDA

Si comparamos tumores metastásicos sin tratamiento respecto a los tumores tratados con deprivación androgénica, vemos que únicamente existen

diferencias en la expresión de HGF ( $p=0,002$ ) y IL-6 ( $p=0,008$ ). Parece que la expresión de IL-6 se eleva en los CAF de pacientes con TDA independientemente del tipo de tejido y lo contrario ocurre con HGF.

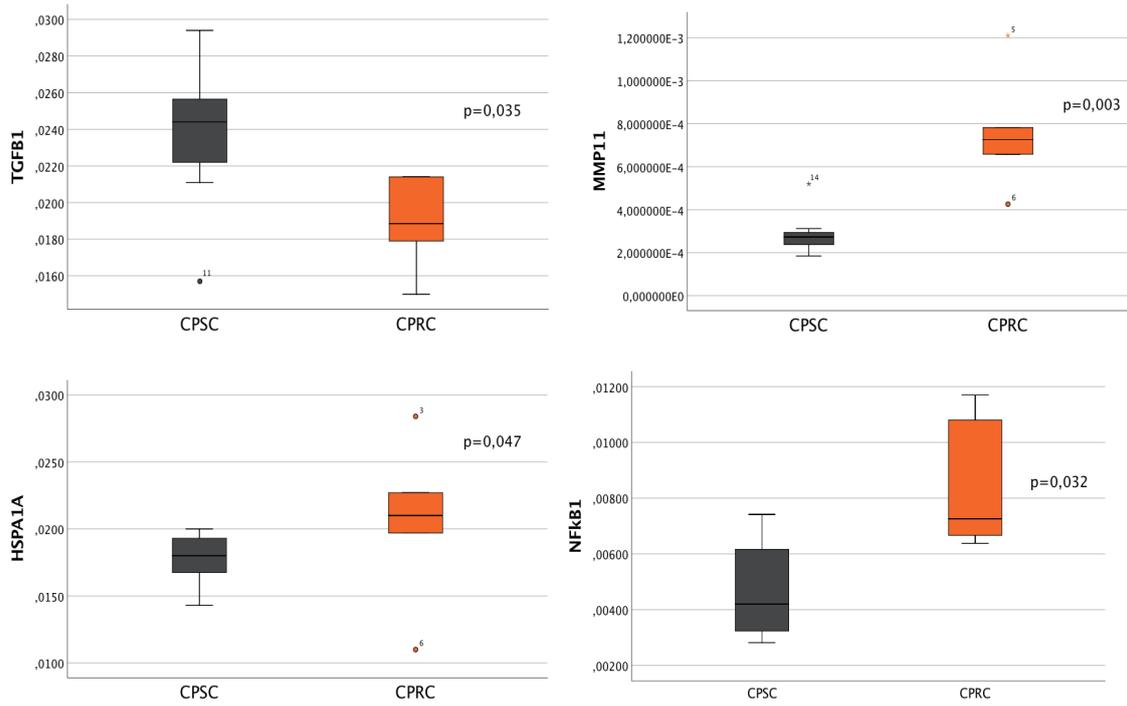


**Figura 32. Boxplot comparando la mediana de expresión de los factores en los CAF de CPM+ con respecto a los CAF de pacientes sometidos a TDA** HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; IL-6; Interleuquina 6 CPM+: Cáncer de próstata metastásico; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

## 5.8 COMPARACIÓN DEL PERFIL GÉNICO DE LOS CAF DE LOS CARCINOMAS DE PRÓSTATA HORMONOSENSIBLES (CPSC) CON LOS HORMONOREFRACTARIOS (CPRC).

Dentro del grupo de tratamiento con TDA los pacientes sensibles y resistentes a la castración también presentan diferencias en las expresiones de los factores estromales.

En el grupo de CPRC se encuentran aumentadas las expresiones génicas de MMP-11 ( $p=0,003$ ), IL-17RB ( $p=0,032$ ) y HSPA1A ( $p=0,047$ ) en comparación con los CAF de CPSC. Por el contrario, la expresión de  $TGF\beta-1$  ( $p=0,035$ ), disminuye en esta fase de la enfermedad.



**Figura 33. Boxplot comparando la mediana de expresión génica de los factores expresados por los CAF de CPSC y los CAF de CPRC. TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante β1; MMP-11: Metaloproteínasa 11; HSPA1A: Proteína de shock térmico; NFκβ: Factor nuclear Kappa B subunidad 1; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración.**

Por último, representamos una tabla-resumen con todas las variaciones observadas a lo largo del trabajo.

**Tabla 16. Diferencias en la expresión de los factores estromales entre los fibroblastos de los distintos grupos de muestras.** Se representan los niveles de expresión de marcadores del primer grupo, indicando si aparecen elevados o disminuidos con respecto al segundo grupo. Únicamente se representan las que resultan estadísticamente significativas. RA: Receptor androgénico; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante B1; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; PDGFβ: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, subunidad b; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-9: Metaloproteínasa 9; MMP-11: Metaloproteínasa 11; IL-6: Interleuquina 6; IL-17RB: Receptor B de Interleuquina 17; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3; NFκβ: Factor nuclear kappa subunidad 1; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; CDH11: Cadherina 11; CXCL12: Factor derivado de célula estromal-1; CXCL14: C-X-C Ligando de quimioquina 14; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; NAF: fibroblastos de tejido normal; T1: Tumor 1; T2: Tumor 2; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; TDA: Terapia de deprivación androgénica; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración.

	T1 vs T2	HBP vs NAF	CPL vs NAF	CPL vs HBP	NAF vs CPM+	CPL vs CPM+	TDA vs NAF	TDA vs CPL	TDA vs CPM+	CPRC vs CPSC
RA							↑	↑		
NUDT6							↑			
FGF7		↑	↑		↑		↑			
FGF10	↑	↓	↓		↓		↓	↑		
TGFβ										↓
HGF							↓	↓	↓	
PDGFβ		↑								
MMP-2	↓	↑	↑		↑		↑			
MMP-9	↓	↓	↓		↓		↓	↓		
MMP-11	↑	↑	↑		↑		↑			↑
IL-6	↑	↑	↑		↑	↓	↑		↑	
IL-17RB	↓	↓	↓		↓		↓	↑		↑
HSF-1		↑		↓			↑	↑		
HSPA1A							↑	↑		↑
STAT3										
NFκβ										
FAP		↓		↑			↓	↓		
CDH11							↓	↓		
CXCL12							↑			
CXCL14				↓						



## *6. Discusión*

---



En este estudio hemos abordado las diferencias de expresión de distintos factores génicos por parte de los fibroblastos situados en el estroma prostático. Se ha trabajado sobre todo el espectro de patologías prostáticas, incluyendo pacientes con HBP y con sospecha de CaP en distintos estadios tomando en estos últimos, además, muestras de tejido periférico al tumor que se ha considerado como tejido control normal. Los 20 marcadores analizados incluyen el receptor androgénico (RA), factores de crecimiento (FGF7, FGF10, NUDT6, HGF, TGF $\beta$ -1, PDGF $\beta$ ), proteínas implicadas en la invasión (MMP-2, MMP-9, MMP-11), inflamación (IL-6, IL-17 RB, STAT3 y NF $\kappa$  $\beta$ ), proteínas implicadas en la interacción epitelio/estroma (CDH11, FAP, CXCL12 y CXCL14) y chaperonas (HSPA1A y HSF-1).

Existen en la literatura múltiples publicaciones basadas en el estudio del epitelio tumoral. Sin embargo, a día de hoy, hay muy pocos estudios basados en el estroma prostático realizados mediante cultivos celulares de fibroblastos de próstatas humanas y su relación con el epitelio.

Nuestro grupo de investigación ha realizado trabajos previos basados en esta línea con este mismo objetivo, encontrar marcadores diagnósticos que permitan diferenciar entre las dos patologías prostáticas más prevalentes y de mayor relevancia socioeconómica y, de este modo, explorar la posibilidad de encontrar dianas terapéuticas. En 2017 publicamos resultados que ya demuestran diferencias en la expresión de algunos de estos factores (56). Uno de los más relevantes fue la elevación de la expresión de IL-17RB en los fibroblastos asociados a tumor (CAF), que podría plantearse como un nuevo marcador de CaP en pacientes con biopsia de próstata negativa.

En el presente trabajo hemos encontrado múltiples interacciones y relaciones entre los factores y las características clínico-patológicas tumorales, como se muestra en el apartado de Resultados, pero discutiremos a continuación solo aquellos datos que pueden tener una trascendencia clínica.

## **6.1 ESTUDIO DEL PERFIL GÉNICO DE LOS CAFs DE CPL EN FUNCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.**

### **6.1.1 Correlación de la expresión génica de los factores con PSA**

En cuanto a la expresión de los factores por parte de los fibroblastos activados tumorales en los tumores clínicamente localizados y las características clínicas, hemos detectado una correlación positiva entre la expresión de NF $\kappa$ B y el valor de PSA, así como una correlación negativa entre los valores de expresión de NUDT6 y TGF $\beta$ -1 con PSA.

No hemos encontrado en la bibliografía ninguna relación entre los andrógenos, el RA o el PSA con los valores de NUDT6. Sin embargo, respecto a TGF $\beta$ -1, diversos autores recogen que disminuye en tumores avanzados, como se expone más adelante (151). Las cifras de PSA se encuentran habitualmente más elevadas en los tumores avanzados que en estadios más precoces, lo que podría explicar una correlación negativa entre los niveles de PSA y TGF $\beta$ -1.

Por otro lado, en el estudio de Torrealba y cols (152), los autores objetivan una correlación negativa entre un subtipo de NF $\kappa$ B, el NF $\kappa$ Bp50, y el estadio tumoral, pero no se observa una clara relación entre los marcadores clásicos como el PSA y este factor.

### **6.1.2 Correlación de la expresión génica de los factores con el estadio tumoral**

Encontramos una clara tendencia a la disminución de TGF $\beta$ -1 y CDH 11 al aumentar el estadio tumoral. En cuanto a TGF $\beta$ -1, esta tendencia se mantiene incluso hasta llegar a fase de CPRC, donde se alcanzan los valores mínimos. Así, los pacientes con tumores más avanzados, presentan una elevación de PSA, con un descenso correlativo de TGF $\beta$ -1. Este último 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 (153). Rosenberg y cols. observan una alteración en la expresión de TGF $\beta$ -1 en las muestras de CaP con respecto a tejido sano (154). Defienden que TGF $\beta$ -1 juega un papel en el

desarrollo del tumor que debe ser investigado. En otro estudio de Brand y cols., concluyen que algún genotipo de TGF $\beta$ -1 parece tener un efecto protector frente a tumores de alto grado y de mal pronóstico (151). Esto refuerza nuestro resultado de encontrarse, al parecer, disminuida su expresión en este tipo de tumores, que son precisamente los de peor pronóstico.

En cuanto a CDH11, se ha asociado una expresión elevada de la misma y una disminución de E-cadherina con progresión tumoral y mal pronóstico en el cáncer de mama de tipo *basal-like* (155). En un trabajo de Lee y cols. se describe que una terapia basada en anticuerpos monoclonales anti CDH11 podría prevenir la aparición de metástasis óseas en cáncer de próstata (156). Estos datos entran en conflicto con nuestros resultados, en los que una mayor expresión de CDH11 se relaciona con menor estadio. Como veremos después, en el apartado de tumores sometidos a deprivación androgénica, la expresión epitelial que analizan esos autores, puede ser diferente de la de los fibroblastos aquí estudiada, siendo necesario realizar investigaciones de diferentes células en co-cultivos de células epiteliales y fibroblastos procedentes de CaP, para determinar la expresión diferencial de la CDH11 en ambos tipos de células y avanzar en el conocimiento del papel de este factor en la interacción epitelio-estroma.

## **6.2 COMPARACIÓN DEL PERFIL GÉNICO DE LOS CAF DE LOS FOCOS TUMORALES EN LOS CASOS DE MULTIFOCALIDAD.**

Comparando las muestras de diferentes focos de cáncer en tumores localizados multifocales, encontramos diferencias significativas en la expresión de los factores. Considerando como tumor principal el más agresivo, vemos que la expresión de FGF10, IL-6 y MMP-11 se encuentra elevada respecto a la del tumor secundario. Por el contrario, las expresiones de IL-17RB, MMP-2 y MMP-9, se encontraron más elevadas en el tumor secundario. Esto favorece la hipótesis de que pueden coexistir diferentes tumores en la próstata neoplásica, siendo uno de ellos el principal, y los otros secundarios con características heterogéneas en cuanto a su expresión genómica (157). Aunque en este trabajo, debido al tamaño muestral y al objetivo principal del mismo, no se han podido realizar análisis de

estas diferencias en relación a las características clínico-patológicas de los diferentes focos tumorales, ni disponemos de RMmp para objetivar el tamaño de los mismos, puede plantearse un estudio en el futuro para identificar los perfiles del estroma de los focos tumorales del CaP, empleando la RMmp y las técnicas de fusión y biopsia dirigida de las que recientemente disponemos en nuestro centro.

### 6.3 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES POR LOS NAF, LOS FIBROBLASTOS DE HBP Y LOS CAF DE CPL, CPM+ Y PACIENTES SOMETIDOS A TDA.

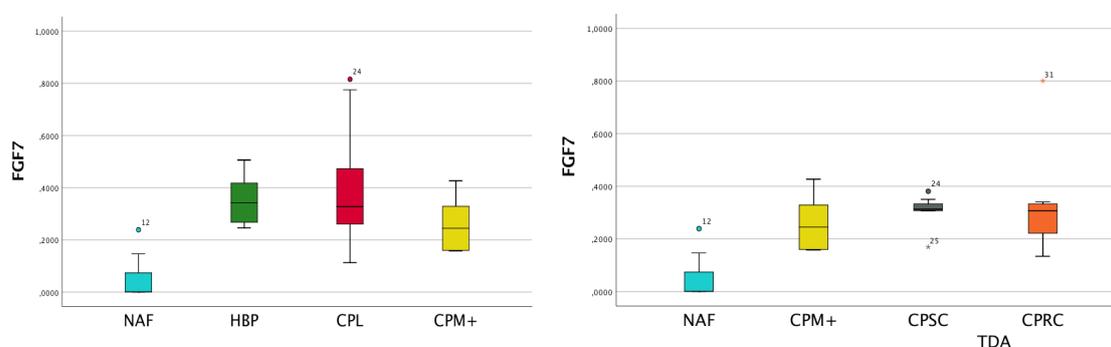
Cuando comparamos la expresión de los factores génicos de los NAF con la de los fibroblastos de HBP y los CAF de estos grupos, observamos un patrón que se repite en todos ellos:

- Existe una **elevación** de la expresión génica de **FGF7, MMP-2, MMP-11 e IL-6** en los fibroblastos de HBP y en los CAF de CPL, CPM+ y de los pacientes sometidos a TDA.
- Por el contrario, aparece una **disminución** de la expresión génica de **FGF10, MMP-9 e IL-17RB** en los fibroblastos de todos los grupos con **respecto a los NAF**.

#### 6.3.1 Factores de crecimiento

Al analizar los factores de crecimiento hemos encontrado un aumento de la expresión de FGF7 en pacientes con HBP respecto a la del tejido normal. Nuestros resultados coinciden con otros estudios publicados como el de Ropiquet y cols. (158), en el que se concluye que la sobreexpresión de FGF7 y FGF2 juegan un importante papel en la proliferación celular anormal que tiene lugar en la HBP. En dicho trabajo también aparece aumentado NUDT6, resultado que no se confirma en nuestro caso. Explican como FGF7 es un importante mitógeno epitelial en las células en cultivo. De acuerdo con estos efectos *in vitro*, el análisis cuantitativo de la proliferación celular por la inmunohistoquímica Ki67 reveló una fuerte correlación de la proliferación epitelial con el contenido de FGF7 en el tejido de HBP, demostrando así su importante papel en la proliferación epitelial anormal.

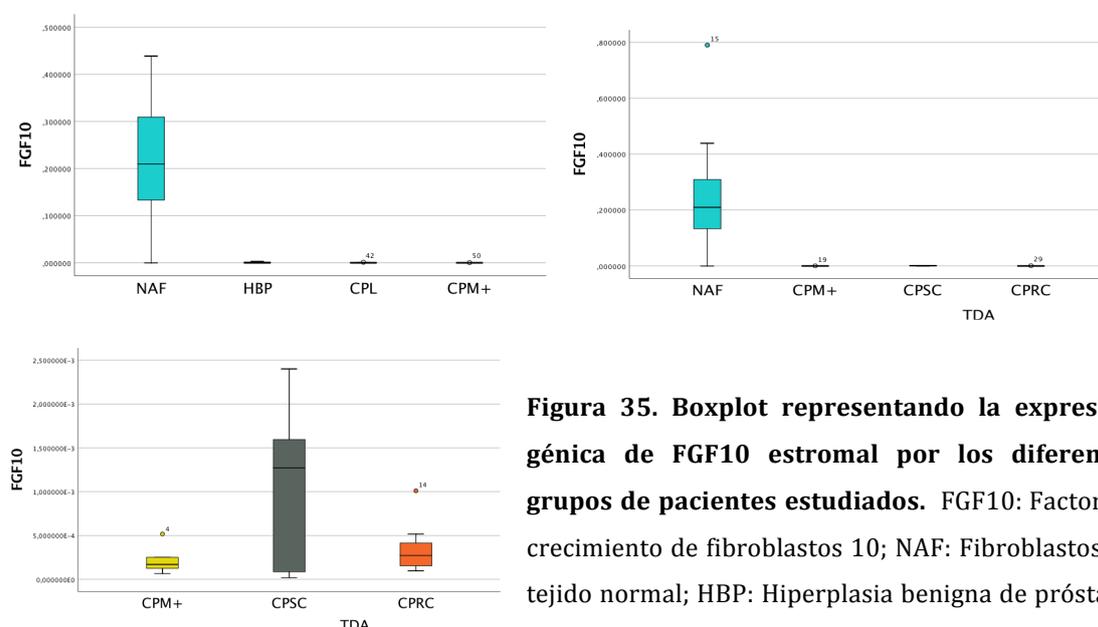
En pacientes con CPL, CPM+ y en pacientes sometidos a TDA, también apreciamos un aumento de FGF7. Se cree que FGF7 es uno de los factores de crecimiento más importantes en el control de la homeostasis prostática, junto con los andrógenos (159). La expresión de FGF7 está regulada por los andrógenos en el estroma prostático, pero no en el epitelio. Cuando existe una activación aberrante de las vías de los FGF, aparece una progresión de CaP y del cáncer de mama (160), ambos tumores dependientes de esteroides. Sin embargo, a pesar de esta influencia androgénica sobre el FGF7, no se diferencia su expresión en el CaP sensible o resistente a castración.



**Figura 34. Boxplot representando la expresión génica de FGF7 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

Lu y cols. (161), han estudiado el papel y la expresión de FGF10 en CaP diferenciado en ratas, observando que la expresión de FGF10 es mucho más restringida que la de FGF2 y que está en relación con la presencia de células de origen muscular en el estroma. 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. Sin embargo, en el trabajo de Lu y cols., observan un aumento de FGF10 de casi 4 veces. Según progresa el tumor, la expresión de FGF10 disminuye e incluso se pierde mientras que la de FGF2 se mantiene detectable, aunque en menor cantidad. Estos autores plantean una expresión de FGF2 y FGF10 anómala, independiente de andrógenos en el estroma

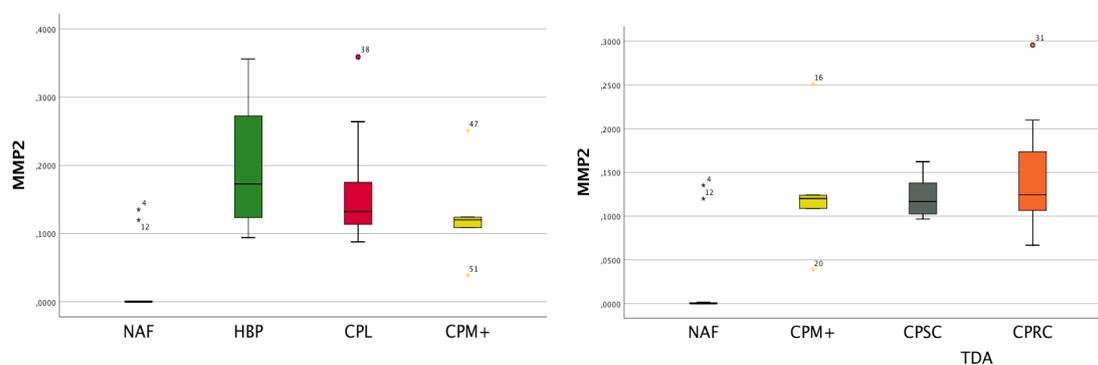
tumoral, que podrían participar en la transmisión de la acción del andrógeno en el estroma a las células epiteliales, lo que se conoce como función andromedina. En otros estudios hablan del papel de FGF10 en la carcinogénesis en sinergia con la sobreexpresión de FGFR1/2 y la sobreexpresión del protooncogen *Src* en células de ratones (162). Sin embargo, hay otros trabajos en los que parece que estas afirmaciones no están tan claras en el caso de la próstata humana. En un trabajo de Ropiquet y cols. (163), se concluye que FGF10 tiene influencia en el desarrollo prostático pero que no parece tener un importante papel en el desarrollo de HBP y de la próstata adulta puesto que sus valores son extremadamente bajos si los comparamos con FGF7. En nuestro trabajo se evidencia una disminución de la expresión de FGF10 en los fibroblastos de HBP y de los tumores localizados, siendo más acusada en los metastásicos. Este descenso podría servir como potencial marcador de tumor avanzado, siendo precisas investigaciones que aclaren el papel de FGF10 como andromedina en CaP. Aunque, a la vista de nuestros resultados, parece evidente, fundamentalmente lo demostrado en tumores sometidos a TDA. En estos casos vuelve a incrementarse la expresión de FGF10, sobre todo en los CPSC, aunque sin alcanzar la significación estadística.



**Figura 35. Boxplot representando la expresión génica de FGF10 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados. FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.**

### 6.3.2 Metaloproteinasas

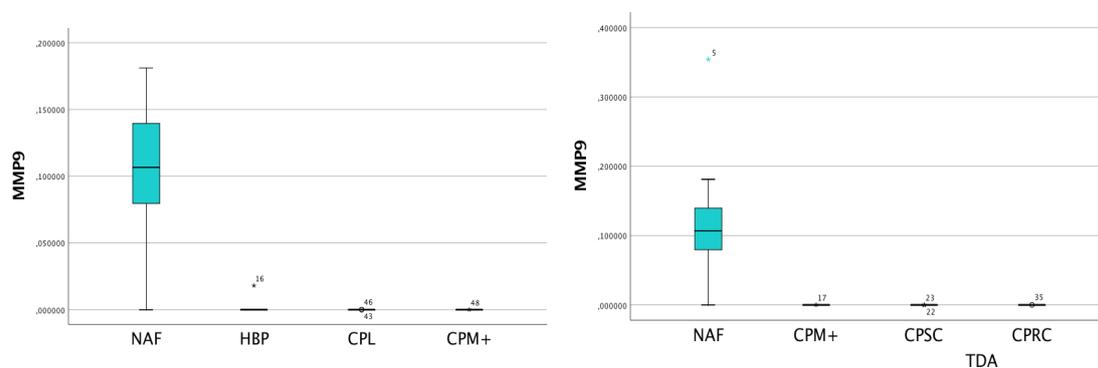
Las MMPs, son moléculas que presentan un papel esencial en la degradación del tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, elementos clave en la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis (164). Son capaces de influir en el comportamiento de las células tumorales *in vivo*, debido a su capacidad para adherirse a factores de crecimiento, receptores celulares de superficie, moléculas de adhesión celular y citoquinas/quimioquinas (165) (166). Al adherirse a factores proapoptóticos, dan lugar a un fenotipo más agresivo a través de la generación de células resistentes a la apoptosis (165). La MMP-2 se asocia con tumores avanzados y se relaciona con la recurrencia del tumor, alcanzando casi la significación estadística (167). La MMP-9 se ha relacionado en otros trabajos con invasión tumoral y desarrollo de metástasis por su especial capacidad para degradar el colágeno tipo IV (168) e inducir angiogénesis (165). La MMP-11 se expresa sobre todo por las células peritumorales y se asocia a progresión tumoral y mal pronóstico (169). Diversos autores lo consideran como un potencial biomarcador para algunos tumores de mama prometastásicos que contienen células mononucleares inflamatorias (164).



**Figura 36. Boxplot representando la expresión génica de MMP-2 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** MMP-2: Metaloproteinasa 2; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

En nuestro estudio observamos que en las muestras de HBP y CaP aparecen aumentadas tanto la MMP-2 como la MMP-11 con respecto al tejido normal. Existe discrepancia en la bibliografía en cuanto a la expresión de estas MMPs. En un

trabajo publicado sobre la HBP provocada por obesidad mantenida por Silva y cols. (170), se observa un incremento de MMP-2 y MMP-9 en pacientes con HBP. No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la expresión de MMP2 o MMP11 entre los fibroblastos de HBP y los de los fibroblastos de los tumores localizados, pero existen otros trabajos en los que se habla de una mayor expresión de MMP-2 en HBP (56) o en CaP (114). 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, pero sus expresiones no se diferencian estadísticamente.

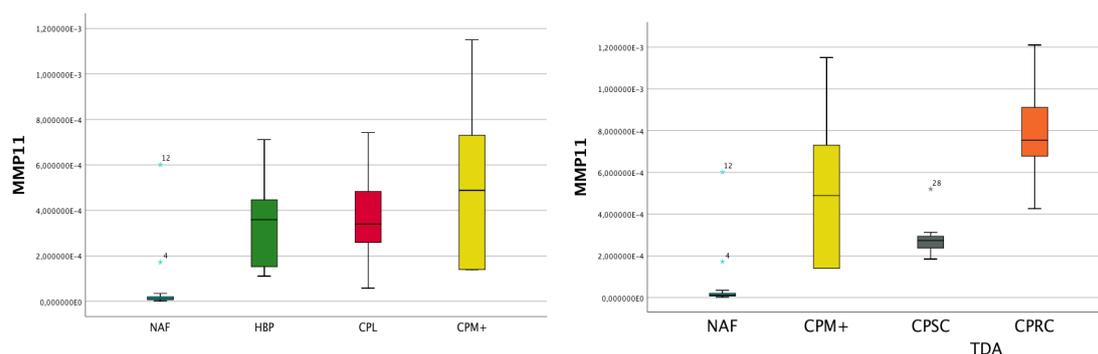


**Figura 37. Boxplot representando la expresión génica de MMP-9 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** MMP-9: Metaloproteinasas 9; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

En cuanto a la MMP-9, su expresión aparece disminuida en los fibroblastos de ambas patologías comparada con la de los NAF. Esto coincide con el estudio de 2013 realizado por Gravina y cols. (9), donde se observa una ausencia o escasa cantidad de MMP-9 en los cultivos de HBP. En otro estudio (171), se encontró una mayor expresión de pro MMP-9 en las muestras de CaP con respecto a las de HBP, resultado que no hemos podido corroborar en nuestro trabajo. Mandel demostró que tanto la sobreexpresión del RA como la estimulación con DHT producen un aumento de MMP-9 (172), 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 coincidiría 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.

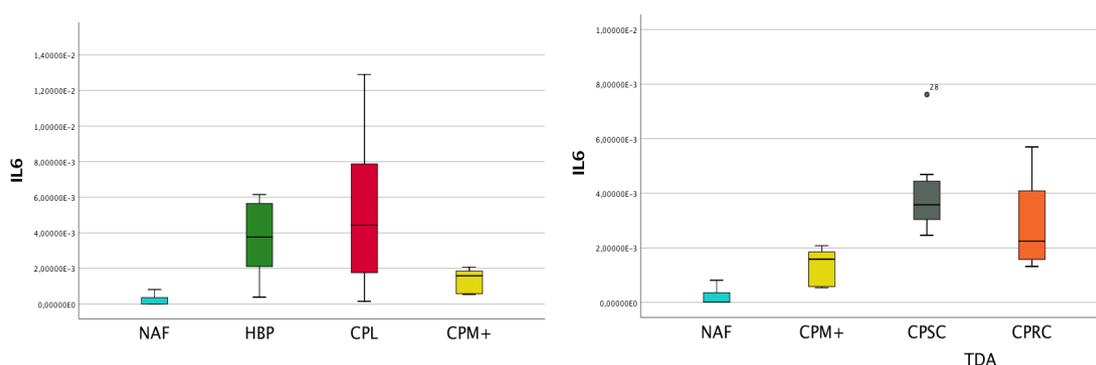
Por último, hemos comprobado que la expresión de MMP-11 se eleva en tumores con respecto a tejido normal y alcanza su mayor expresión en muestras de CPRC. La MMP-11 está relacionada con la progresión tumoral y el pronóstico clínico. En el caso del CaP también se relaciona con una mayor probabilidad de recidiva bioquímica (112). Se expresa únicamente 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 (173). Sus niveles se correlacionan positivamente con la suma de Gleason del tumor, el estadio y la presencia de metástasis (174). Además, la MMP-11 se relaciona estrechamente con el tiempo de supervivencia, así niveles elevados predicen una menor supervivencia (174). Por ello, Nonsrijun lo propone como un marcador pronóstico (174). Esto confirma nuestros hallazgos, puesto que la expresión de MMP-11 alcanza los niveles máximos en CPRC, tumores con peor pronóstico. En el caso de los pacientes con HBP, no hemos encontrado trabajos en la bibliografía que relacionen esta patología con niveles elevados de MMP-11, lo cual puede abrir una nueva vía de investigación que permita conocer mejor la génesis de la HBP y su relación con el CaP.



**Figura 38. Boxplot representando la expresión génica de MMP-11 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** MMP-11: Metaloproteinasa 9; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

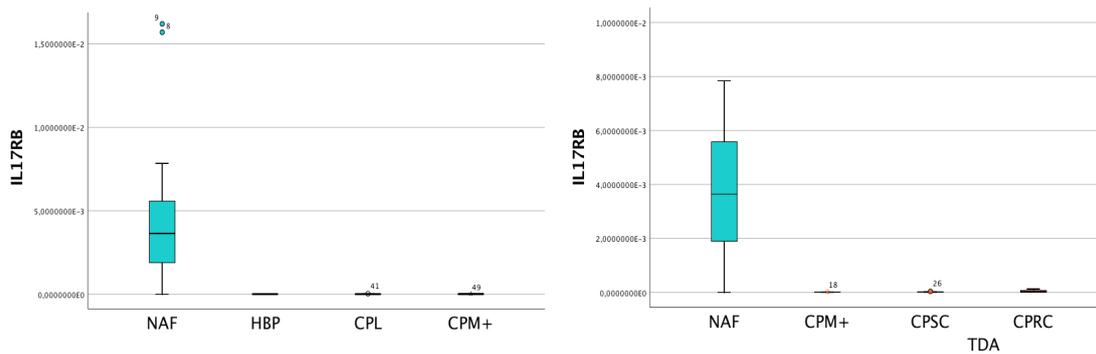
### 6.3.3 Inflamación

En cuanto a los factores relacionados con la inflamación, nuestros resultados muestran una elevación de IL-6 tanto en pacientes con HBP como en pacientes con CaP, lo cual está en consonancia con que la inflamación crónica mantenida pueda tener un importante papel en la progresión de ambas patologías (175).



**Figura 39. Boxplot representando la expresión génica de IL-6 estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** IL-6: Interleuquina 6; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

Con respecto a la IL-17RB, en lo publicado hasta ahora por nuestro propio grupo, su expresión aparecía elevada en pacientes con CaP (56), por lo que se propuso como un posible marcador diagnóstico en pacientes con biopsia de próstata negativa y sospecha de CaP, puesto que IL17 es una de las citoquinas que se eleva en la inflamación linfocítica del estroma de CaP (176). En nuestro estudio actual este resultado se queda a las puertas de la significación estadística, lo que indica que, probablemente, con un mayor número de muestras, se alcanzaría el mismo resultado.



**Figura 40. Boxplot representando la expresión génica de IL-17RB estromal por los diferentes grupos de pacientes estudiados.** IL-17RB: Receptor B de interleuquina 17; NAF: Fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; CPL: Cáncer de próstata localizado; CPM+: Cáncer de próstata metastásico; CPSC: Cáncer de próstata sensible a la castración; CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración; TDA: Terapia de deprivación androgénica.

El hecho de que en nuestros resultados aparezca un patrón de factores que aumentan o disminuyen de la misma manera en HBP y CaP, e incluso en todos los estadios de CaP, favorece la teoría de que en la próstata se producen una serie de cambios que son compartidos por ambas patologías. Probablemente por influencia de otros factores del estroma o por la localización donde se inicien, se desarrolle una u otra.

#### 6.3.4 Factores distintivos de HBP.

- En los fibroblastos de HBP además aparece un aumento de expresión de PDGF $\beta$ , HSF-1 y una disminución en la expresión de FAP comparado con los NAF.

En cuanto a la elevación en la expresión de PDGF $\beta$  por parte de los fibroblastos de HBP, ya en los años noventa se describió que este factor tiene un importante poder mitótico sobre las células del tejido conectivo, células musculares lisas vasculares, células gliales y células epiteliales especializadas (177, 178). También se ha demostrado que PDGF $\beta$  estimula la secreción de ácido hialurónico durante la proliferación de las células musculares lisas vasculares (55). 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 (179). Pullen (55), refiere que cada vez hay más evidencia de la implicación de PDGF $\beta$  en la etiología de la HBP, habiendo demostrado que induce la proliferación de las células estromales. Además, observó que 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. Por todo ello y dado que sólo está elevado en este grupo de pacientes, podría considerarse como un marcador diagnóstico de HBP y analizar su papel en la posible progresión de la enfermedad. De esta manera, podría plantearse como diana terapéutica potencial, optimizando el tratamiento médico actual basado en alfa-bloqueantes o inhibidores de la 5-alfa-reductasa, cambiando definitivamente la historia natural de la enfermedad, sus complicaciones y la necesidad de cirugía desobstructiva.

No hemos encontrado en la bibliografía otros trabajos que analicen en pacientes con HBP los niveles de HSF-1 o FAP.

- Por otro lado, en los fibroblastos de HBP aparece un aumento de la expresión de CXCL14 al compararla con los CAF de CPL.

Nuestros hallazgos coinciden con los obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo (32). Aunque algunos estudios relacionan los niveles de CXCL14 con la agresividad del CaP, y algunos autores reportan efectos antiangiogénicos y antitumorales en diferentes tipos de cáncer, nosotros ni en este, ni en trabajos previos, hemos encontrado diferencias significativas de este marcador en pacientes con CaP.

### **6.3.5 Factores distintivos de CPL respecto a HBP**

- A parte de la diferencia en CXCL14, al comparar los fibroblastos de HBP con los CAF de CPL persiste el aumento en la expresión de HSF-1 y la disminución de FAP.

HSF-1 es crucial para mantener la homeostasis y la protección contra el estrés oxidativo, pero también tiene un importante papel en la biología tumoral promoviendo la proliferación y la supervivencia celular a través del estímulo oncogénico (137). En nuestro trabajo observamos un aumento de la expresión de HSF-1 en pacientes con HBP respecto a la detectada en CaP, que nos podría ayudar a distinguir ambas patologías. Así en pacientes con una disminución en la expresión de HSF-1 se podría aumentar la sospecha de CaP y someter a estos pacientes a una biopsia prostática.

En cuanto a la FAP, se trata de una proteasa integral de membrana tipo II que se expresa en la superficie de los CAFs, en el estroma de la mayor parte de los tumores sólidos, pero no en tejido normal. También se ha observado en algunos sarcomas de tejido blando, artritis reumatoide y fibrosis crónica (180). En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas entre la expresión de FAP por los fibroblastos de tejido normal y de CaP, sin embargo, hemos visto un aumento de la misma si la comparamos con la de los fibroblastos de HBP. Dado que es una proteína que se expresa significativamente en pacientes con CaP, se está buscando la forma de emplearlo como diana terapéutica. Así, desde hace unos años Brennen y cols. están estudiando profármacos dirigidos a FAP (ASGPAGP-A12ADT y ERGETGP-S12ADT) (180). Sus datos parecen confirmar una gran eficacia contra las células tumorales tanto de cáncer de mama como de próstata, pero aún se necesitan más estudios para mejorar la especificidad de estos profármacos y disminuir su actividad sobre los tejidos no involucrados.

## **6.4 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES POR LOS CAF DE CPL, LOS DE CPM+ Y LOS DE PACIENTES SOMETIDOS A TDA.**

### **6.4.1 Comparación de la expresión génica de los CAF en tumores localizados y metastásicos**

Únicamente hemos observado una disminución significativa de la expresión de IL-6 en el caso de CPM+ respecto a la de CPL. Esto difiere con lo publicado hasta ahora, donde se había descrito un aumento de los niveles séricos en pacientes con

CaP metastásico incluso con CPRC comparado con pacientes sanos y con pacientes con CPL (181, 182). Hay trabajos que relacionan un aumento de IL-6 en pacientes sometidos a cirugía radical con metástasis óseas, lo cual parece indicar que niveles séricos altos de esta interleuquina están relacionados con progresión de CaP y metástasis (183). También se han relacionado los niveles elevados de este factor con una menor supervivencia en pacientes con CPRC (184). Todos estos datos apuntan a que podría tener cierto papel en la progresión de CaP que no hemos podido de demostrar en nuestro estudio en esta fase de la enfermedad, pero sí en pacientes tratados con deprivación androgénica, como veremos más adelante.

#### 6.4.2 Cambios debidos a TDA

- Aparece un **aumento** en la expresión génica de **RA, HSF-1 y HSPA1A** por parte de los CAF de pacientes con TDA.

Como adelantábamos en la introducción, el aumento de la expresión del RA se debe a una respuesta adaptativa al tratamiento con TDA, ya que no se observó en pacientes con HBP ni apenas en pacientes con CPL, mientras que llegó al 20% de los pacientes CPRC (95).

En cuanto al HSF-1, en el trabajo de Bjork y cols. (185), se asocia el aumento de HSF-1 con progresión de la enfermedad, siendo un predictor independiente de necesidad de emplear terapia de segunda línea y una pobre supervivencia cáncer específica en pacientes con CaP clínicamente localizado sometidos a PR. Por ello, proponen HSF-1 como un nuevo marcador pronóstico de CaP. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de HSF-1 en cuanto a estadio tumoral ni en pacientes metastásicos, únicamente en pacientes sometidos a TDA. De esta manera, nuestros pacientes sometidos a TDA que son pacientes con tumores avanzados o metastásicos, expresaron niveles más elevados de HSF-1 que los pacientes con tumores localizados. Esto coincide con los hallazgos del estudio realizado por Yang y cols. en el que demostraron un aumento del mismo en ratones con bloqueo del receptor androgénico respecto a los ratones controles (186), así como la regulación de la expresión mediada por los andrógenos. Al administrar testosterona a los ratones, los niveles de HSF-1

disminuían mientras que con el antiandrógeno flutamida aumentaban, normalizándose tras administrar de nuevo testosterona. Esto indica una dependencia androgénica total en su regulación y abre un camino para investigar este factor en pacientes con CaP tratados con TDA.

HSPA1A pertenece al grupo de las proteínas de choque térmico. Las HSP tienen un fuerte efecto citoprotector y se comportan como chaperonas moleculares, participando en la regulación de la señalización celular y de la transcripción (187). Las HSP se sobreexpresan en un gran número de tumores, y están implicadas en la proliferación celular, diferenciación, invasión, metástasis y muerte celular (188). En el cáncer de próstata, HSP70 tiene efecto citoprotector, inhibiendo la apoptosis, modulando el ciclo celular, la invasión y la metástasis (189) así como la actividad transcripcional del RA y su estabilidad (190).

En nuestro trabajo, hemos podido observar una elevación en la expresión de HSPA1A en pacientes tratados con TDA, sobre todo en aquellos con CPRC. Y es que se sabe que HSPA1A se une al dominio N-terminal del RA y modula su función en las células de CaP (191). La inhibición de HSPA1A produce una disminución en la actividad transcripcional del RA y también de ARV7. Esto lo convierte en una interesante diana terapéutica. La enzalutamida actúa inhibiendo la función del RA a través del dominio L-terminal (192), la expresión de variantes del RA como ARV7 que bloquean el LBD, es uno de los mecanismos más comunes de resistencia a la enzalutamida (193). En el estudio de Dong y cols. (191) se sugiere que los inhibidores de HSPA1A pueden inhibir la actividad del RA y sus variantes “splice” como ARV7, y dar lugar a una línea nueva de tratamiento para los pacientes con CPRC resistentes a la enzalutamida. Kita y cols. (194) estudiaron la eficacia de dos inhibidores de HSP70, la quercetina y VER155008, contra las células de CPRC que expresaban ARV7. Se vio que la presencia de inhibidores de HSP70 disminuye la expresión de ARV7, así como el aumento de la misma al elevarse la expresión de HSPA1A. Todavía no disponemos de inhibidores de HSP70 para el uso en la práctica clínica debido a su toxicidad renal (195), pero es una línea para continuar investigando posibles nuevos tratamientos, ratificada con nuestros resultados sobre HSPA1A.

- Se objetiva una **disminución** en la expresión de **HGF, FAP y CDH11** por parte de los CAF de pacientes sometidos a TDA.

HGF es una proteína implicada en el desarrollo del CaP que se encarga de controlar las uniones intercelulares estrechas (54). Hay estudios que indican que HGF aumenta la permeabilidad paracelular en cáncer de mama y en células endoteliales (196). Esto puede ocurrir en otros tipos celulares como en las células de CaP, permitiendo la progresión tumoral (197). En nuestro trabajo, se demuestra que la expresión de HGF se encuentra disminuida en pacientes sometidos a TDA si la comparamos con la de tejido normal, CPL e incluso CPM+ sin tratamiento. Esto probablemente se deba a una relación directa de la acción de los andrógenos sobre HGF, aunque no hemos encontrado ningún trabajo que apoye esta teoría. Por otro lado, en un trabajo de Dayani y cols., se describe el HGF como un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión en pacientes con CPSC. De forma que, a mayor nivel de HGF mayor probabilidad de progresar a CPRC (198).

En nuestra serie de pacientes, aquellos sometidos a TDA presentaron una menor expresión de CDH11 por parte de los fibroblastos estromales en comparación con los CAF sin deprivación androgénica. Este resultado contradice lo publicado por Lee y cols. donde afirman que la TDA produce un aumento de los niveles de CDH11, ya que, en su serie, de los tumores que habían sido sometidos a TDA y habían recidivado, un 85% tenían una sobreexpresión de CDH11, mientras que sólo el 14% de los que no han recibido esta terapia, lo expresaban (199). No obstante, los datos de Lee y cols. se refieren un modelo de cáncer de próstata metastásico en ratones, no en CaP humano, por lo que dado el papel relevante de CDH11 en el desarrollo de metástasis en diversos tumores, la interacción de la deprivación androgénica en la expresión de CDH11 en el estroma prostático humano debería ser estudiada en profundidad.

#### 6.4.3 Comparación de la expresión génica de los NAF con los CAF de pacientes sometidos a TDA

- En los CAF de pacientes sometidos a TDA se observa, a parte de los cambios descritos previamente, **un incremento** en la expresión génica de **NUDT6** y **CXCL12** con respecto a los NAF.

NUDT6 está codificado por el mismo ARN que los factores de los FGF, sin embargo, no se han encontrado los sustratos sobre los que actúa (200). Este es el primer estudio que demuestra la sobreexpresión de NUDT6 en CaP. Aunque no hemos encontrado ningún estudio que analice la relación existente entre los andrógenos y este factor, podemos afirmar que existe una relación inversa entre la expresión de NUDT6 y el nivel de andrógenos ya que, además de aumentar en pacientes con TDA, tiene una correlación inversa con los niveles de PSA que, como se ha comentado previamente, es una molécula dependiente de andrógenos.

Respecto a CXCL12 se han relacionado niveles elevados con metástasis óseas en CaP (201). Además, CXCL12 promueve la activación y proliferación del RA, siendo capaz de hacerlo en ausencia de andrógenos (202). Esto coincide con nuestros resultados, ya que los pacientes sometidos a TDA, son portadores de tumores metastásicos al inicio del tratamiento. Se ha visto que CXCL12 se expresa constitutivamente en tejidos que sirven como lugares metastásicos como el pulmón, el hueso y el hígado. Las células cancerígenas migran a estos lugares de una forma CXCL12-dependiente (203).

#### 6.4.4 Comparación de la expresión génica de los CAF de pacientes metastásicos sin tratamiento con aquellos sometidos a TDA

- Tras esta comparación encontramos una menor expresión de HGF por parte de los CAF de pacientes sometidos a TDA respecto a los de CPM+, como ya hemos comentado, así como un aumento en la expresión de IL-6.

Es conocida la influencia de IL-6 sobre el RA. Hosbich fue el primero que observó que IL-6 induce la actividad del RA en las células de CaP de una forma independiente de andrógenos (204). También objetivó que la bicalutamida era capaz de inhibir esta activación. Además, se ha demostrado una regulación positiva de IL-6 sobre RA (205). Estos hallazgos sugieren que IL-6 ejerce su actividad sobre el RA de dos maneras, aumentando su expresión génica y, por otro lado, es capaz de activarlo, sin necesidad de andrógenos. Así, al estar bloqueado el RA, aumentaría IL-6 para tratar de ejercer su actividad sobre el mismo. Existe la hipótesis de que IL-6 tiene un importante papel en el paso de CPSC a CPRC, debido a que es capaz de promover el crecimiento hormono-dependiente de las células de CaP a concentraciones muy bajas de andrógenos *in vitro*, así como en ratones castrados (205). En nuestros resultados, no hemos observado diferencias en los niveles de expresión génica de IL-6 entre los CAF de CPSC y CPRC.

Todo esto tiene importantes repercusiones a nivel de tratamiento. Dado que IL-6 confiere resistencia a los agentes citotóxicos, se ha podido comprobar que los niveles séricos de IL-6 pre quimioterapia en pacientes CPRC, pueden predecir la respuesta clínica y de PSA a docetaxel (206). Por ello, se están desarrollando nuevas terapias diana contra IL-6 y su receptor. Estos estudios no sólo se están desarrollando en el CaP, también en otros tumores aunque no con buenos resultados para todos ellos, por lo que continúan en fase de investigación (207).

## **6.5 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES POR LOS CAF DE CPSC Y CPRC.**

Como ya se ha descrito con anterioridad, los pacientes con CRPC presentan una expresión elevada de MMP-11 y HSPA1A con respecto al resto de pacientes sometidos a TDA. Pero además, aparece una elevación en la expresión de NF $\kappa$ B, que no se detecta en otros grupos. Por ello, se está estudiando la inhibición de este factor en células de CPRC (PC3 y DU45). En estas células, el efecto de la simvastatina con un inhibidor de NF $\kappa$ B, regula la apoptosis disminuyendo el crecimiento celular (208, 209). La inhibición de NF $\kappa$ B disminuye la expresión de RA a través de la degradación de proteosoma mediada por ubiquitina (210).

Nuestros hallazgos, junto con los de los autores citados abren líneas de investigación prometedoras en CaP avanzado, basadas en el control de NF $\kappa$ B.

Como también se ha comentado previamente, los valores de TGF $\beta$ -1 disminuyen según avanza el estadio tumoral, alcanzando su mínimo valor en CPRC. Pero parece que existe un polimorfismo del TGF $\beta$ -1 que presenta dos alelos diferentes. Existen trabajos como el de Brand y cols. (151) que, como ya se ha mencionado, hablan de un alelo protector frente a CaP avanzado. Hay otros trabajos como el de Ewart-Toland et cols. (211) en el que se observa un aumento de TGF $\beta$ -1 en tumores avanzados, dado que se hacen resistentes a su inhibición de la proliferación celular. Parece claro que TGF $\beta$ -1 tiene un papel en la progresión de CaP, aunque no se conoce del todo el mecanismo por lo que se podrían plantear nuevos estudios acerca de la posibilidad de que los distintos alelos de este gen, actúen de forma diferente sobre la progresión.

En resumen, hemos encontrado diferencias en la expresión de los marcadores expresados por los fibroblastos en los distintos grupos de muestras; HBP, CaP, tejido normal. Entre ellas, podemos destacar la elevación de PDGF $\beta$  y CXCL14 en pacientes con HBP lo que podría plantearlos como marcadores diagnósticos de la misma. También hemos obtenido una elevación de MMP-11 y HSF-1 en los CaP en fases más avanzadas, lo que sugiere que podrían corresponder con marcadores pronósticos de CaP.

Del mismo modo, hemos demostrado diferencias en expresiones génicas que permiten estudiar posibles dianas terapéuticas con una probable aplicabilidad clínica futura, como anticuerpos monoclonales anti IL-6 y su receptor o anti CDH11, profármacos dirigidos contra FAP o HSPA1A como diana terapéutica en fase de CPRC. Aunque para todo ello se precisan más estudios que consigan validar externamente nuestros resultados con mayor número de pacientes.

## Limitaciones.

La primera limitación de este estudio es el pequeño tamaño muestral. Esto se debe, entre otros motivos, a la complejidad de la metodología para el procesado del tejido obtenido durante el cultivo celular. No obstante, consideramos que el número estimado es suficiente para obtener datos fiables para demostrar los objetivos establecidos.

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 encuentre un carcinoma y sí en la muestra usada para diagnóstico. En el momento actual se dispone de mejores métodos como son 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.

Para realizar los análisis estadísticos de este trabajo, hemos empleado la suma de Gleason y la clasificación ISUP. Aunque en la mayoría de pacientes de tumores localizados se utilizó la suma de Gleason de la pieza de PR, en los pocos casos tratados con RT empleamos la suma de Gleason de la biopsia prostática que no siempre coincidirá con la del tumor, siendo 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, ya que se caracteriza por una progresión lenta requiriendo, por tanto, una larga evolución, especialmente en aquellos casos de buen pronóstico, no siendo objeto del presente estudio.

*Conclusiones*

---



- 1) Existen diversas correlaciones entre los factores estudiados expresados por los fibroblastos activados tumorales. Además, se evidencia una **correlación positiva** entre los niveles de expresión de **NFkB1** y los de PSA. Por el contrario, existe una **correlación negativa** entre los niveles de expresión de **NUDT6** y **TGFβ-1**, respecto a las cifras de PSA.
- 2) Aparecen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de **FGF10**, **TGFβ-1**, **IL-17RB**, **CDH11** y **CXCL14** según el estadio tumoral, más patente en los casos de **CDH11** y **TGFβ-1**, en los que se evidencia que a mayor estadio tumoral, menor es la expresión del factor. Sin embargo, no hemos encontrado una asociación significativa entre la expresión de ninguno de los factores por los CAF y la clasificación ISUP del tumor.
- 3) Al comparar la expresión génica de los factores por los fibroblastos de HBP y por los CAF de tumores localizados respecto a la de los fibroblastos del estroma normal, encontramos:
  - a. Un **aumento** de la expresión de **FGF7**, **MMP-2**, **MMP-11** e **IL-6** por parte de los fibroblastos de HBP y de los CAF respecto a la de los fibroblastos normales.
  - b. Una **disminución** de la expresión **FGF10**, **MMP-9** e **IL-17RB** en los fibroblastos de HBP y en los CAF, respecto a la de los fibroblastos normales.
  - c. En los fibroblastos de HBP, además, aparece **umentada** la expresión de **PDGFβ** y **HSF-1**, así como una **disminución** de **FAP**, respecto a su expresión en los NAF.
- 4) Si comparamos las expresiones de los fibroblastos de HBP con la de los fibroblastos de los tumores localizados, encontramos un **aumento** significativo de la expresión de **HSF-1** y **CXCL14** en el estroma hiperplásico,

donde se evidencia también una **disminución** de la expresión de **FAP**, respecto a la del estroma tumoral.

- 5) En los tumores multifocales, encontramos una **mayor expresión** de **FGF10**, **MMP-11** e **IL-6** en los CAF del **tumor principal**, considerado el más agresivo, en relación al tumor secundario. Por el contrario, **MMP-2**, **MMP-9** e **IL-17RB** están más expresados en los CAF del **tumor secundario** respecto a los del principal.
  
- 6) En el estudio de los cánceres de próstata metastásicos, encontramos:
  - a. Respecto a las expresiones en los fibroblastos normales, las mismas diferencias que encontrábamos con los CAF del tumor localizado, es decir, un **aumento** en la expresión génica de **FGF7**, **MMP-2**, **MMP-11** e **IL-6** en el estroma de los tumores metastásicos y una **disminución** de **FGF10**, **MMP-9** e **IL-17RB**.
  
  - b. Respecto a las expresiones en el estroma de los tumores localizados, únicamente objetivamos un **descenso** de la expresión de **IL-6** en el estroma metastásico.
  
- 7) En los pacientes sometidos a deprivación androgénica como tratamiento de un tumor metastásico, objetivamos:
  - a. Respecto a la expresión en los NAF, **aumenta** la expresión de los mismos factores que en los casos anteriores, es decir, de **FGF7**, **MMP-2**, **MMP-11**, **IL-6** y, además, también del **receptor androgénico**, de **NUDT6**, **HSF-1**, **HSPA1A** y **CXCL12**. Se encuentra disminuida la expresión de **FGF10**, **MMP-9** e **IL-17RB**, pero además, también desciende la expresión de **HGF**, **FAP** y **CDH11** en el estroma sometido a deprivación androgénica.

b. Respecto a las expresiones en el estroma de los tumores localizados, se encuentra una **elevación** de la expresión del **receptor androgénico**, de **FGF10**, **IL-17RB**, **HSF1** y **HSPA1A** en el estroma sometido a deprivación androgénica. Sin embargo, la expresión de **HGF**, **MMP-9**, **FAP** Y **CDH11 disminuye** en este grupo.

c. Respecto a las expresiones en el estroma de los tumores metastásicos, vemos que únicamente existen diferencias en la expresión de **HGF**, que **disminuye** en pacientes sometidos a deprivación androgénica, y de **IL-6**, que **aumenta** su expresión.

- 8) En el grupo de **CPRC** encontramos **umentada** la expresión génica de **HSPA1A**, **MMP-11** e **IL-17RB** por parte de los CAF, respecto a los del estroma de CPSC, en el que se sobreexpresa **TGFβ-1**.



## *Bibliografía*

---



1. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 1987;8(3):338-62.
2. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer.* 2003;107(1):1-10.
3. Cunha GR, Chung LW. Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem.* 1981;14(12):1317-24.
4. Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* 2004;67(5):417-34.
5. Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92(4):221-36.
6. Cunha GR, Young P. Inability of Tfm (testicular feminization) epithelial cells to express androgen-dependent seminal vesicle secretory proteins in chimeric tissue recombinants. *Endocrinology.* 1991;128(6):3293-8.
7. Goldstein AS. A symbiotic relationship between epithelial and stromal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(51):20356-7.
8. Costa-Almeida R, Soares R, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(1):240-51.
9. Gravina GL, Mancini A, Ranieri G, Di Pasquale B, Marampon F, Di Clemente L, et al. Phenotypic characterization of human prostatic stromal cells in primary cultures derived from human tissue samples. *Int J Oncol.* 2013;42(6):2116-22.
10. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel).* 1996;155(2):81-93.
11. Blanchere M, Mestayer C, Saunier E, Broshuis M, Mowszowicz I. Transforming growth factor beta in the human prostate: its role in stromal-epithelial interactions in non-cancerous cell culture. *Prostate.* 2001;46(4):311-8.
12. Niu Y, Xu Y, Zhang J, Bai J, Yang H, Ma T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. *BJU Int.* 2001;87(4):386-93.
13. Carruba G, Webber MM, Quader ST, Amoroso M, Cocciadiferro L, Saladino F, et al. Regulation of cell-to-cell communication in non-tumorigenic and malignant human prostate epithelial cells. *Prostate.* 2002;50(2):73-82.
14. Montico F, Hetzl AC, Candido EM, Favaro WJ, Cagnon VH. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron.* 2011;42(6):642-55.
15. Wang YC, Yu SQ, Wang XH, Han BM, Zhao FJ, Zhu GH, et al. Differences in phenotype and gene expression of prostate stromal cells from patients of varying ages and their influence on tumour formation by prostate epithelial cells. *Asian J Androl.* 2011;13(5):732-41.
16. van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Hendriksen PJ, van der Kwast TH, Jenster G. Gene expression profiling of the human prostate zones. *BJU Int.* 2006;98(4):886-97.

17. Shaikhibrahim Z, Lindstrot A, Ellinger J, Rogenhofer S, Buettner R, Wernert N. Genes differentially expressed in the peripheral zone compared to the transitional zone of the normal human prostate and their potential regulation by ETS factors. *Mol Med Rep.* 2012;5(1):32-6.
18. Hayward SW, Cunha GR, Dahiya R. Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;784:50-62.
19. 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):5002-11.
20. 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.* 2005;146(1):13-8.
21. Tarin D. Tissue interactions in morphogenesis, morphostasis and carcinogenesis. *J Theor Biol.* 1972;34(1):61-72.
22. Thompson TC, Timme TL, Kadmon D, Park SH, Egawa S, Yoshida K. Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras+myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. *Mol Carcinog.* 1993;7(3):165-79.
23. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1324-31.
24. Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 2007;67(9):4244-53.
25. Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol.* 2005;173(1):10-20.
26. McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol.* 1978;15(4):340-5.
27. Crona DJ, Whang YE. Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers (Basel).* 2017;9(6).
28. Martinez-Breijo S, Chantada-Abal V, Aller-Rodriguez M, Bohorquez-Cruz M, Sacristan-Lista F, Ponce-Diaz J, et al. [Castration resistance mechanisms in prostate cancer.]. *Arch Esp Urol.* 2018;71(8):628-38.
29. Saporita AJ, Zhang Q, Navai N, Dincer Z, Hahn J, Cai X, et al. Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(43):41998-2005.
30. Garraway WM, Collins GN, Lee RJ. High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community. *Lancet.* 1991;338(8765):469-71.
31. Boyle P. Some remarks on the epidemiology of acute urinary retention. *Arch Ital Urol Androl.* 1998;70(2):77-82.
32. Glynn RJ, Campion EW, Bouchard GR, Silbert JE. The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Normative Aging Study. *Am J Epidemiol.* 1985;121(1):78-90.
33. Rhodes T, Girman CJ, Jacobsen SJ, Roberts RO, Guess HA, Lieber MM. Longitudinal prostate growth rates during 5 years in randomly selected community men 40 to 79 years old. *J Urol.* 1999;161(4):1174-9.

34. Girman CJ, Jacobsen SJ, Guess HA, Oesterling JE, Chute CG, Panser LA, et al. Natural history of prostatism: relationship among symptoms, prostate volume and peak urinary flow rate. *J Urol*. 1995;153(5):1510-5.
35. Taub DA, Wei JT. The economics of benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms in the United States. *Curr Urol Rep*. 2006;7(4):272-81.
36. McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am*. 1990;17(3):477-86.
37. Thomson AA, Cunha GR, Marker PC. Prostate development and pathogenesis. Differentiation. 2008;76(6):559-64.
38. Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13(4):285-96.
39. Montie JE, Pienta KJ. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*. 1994;43(6):892-9.
40. Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Cornet A, Klug M, McNamara M, et al. Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate*. 1999;38(2):159-65.
41. Hammond GL, Kontturi M, Maattala P, Puukka M, Vihko R. Serum FSH, LH and prolactin in normal males and patients with prostatic diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;7(2):129-35.
42. Prins GS. Prolactin influence on cytosol and nuclear androgen receptors in the ventral, dorsal, and lateral lobes of the rat prostate. *Endocrinology*. 1987;120(4):1457-64.
43. MacDonald R, Ishani A, Rutks I, Wilt TJ. A systematic review of Cernilton for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*. 2000;85(7):836-41.
44. Carrero-Lopez VM, Cozar-Olmo JM, Minana-Lopez B. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. A review of current evidence. *Actas Urol Esp*. 2016;40(5):288-94.
45. Madersbacher S, Alivizatos G, Nordling J, Sanz CR, Emberton M, de la Rosette JJ. EAU 2004 guidelines on assessment, therapy and follow-up of men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction (BPH guidelines). *Eur Urol*. 2004;46(5):547-54.
46. Barendrecht MM, Abrams P, Schumacher H, de la Rosette JJ, Michel MC. Do alpha1-adrenoceptor antagonists improve lower urinary tract symptoms by reducing bladder outlet resistance? *Neurourol Urodyn*. 2008;27(3):226-30.
47. Kyprianou N, Davies P. Association states of androgen receptors in nuclei of human benign hypertrophic prostate. *Prostate*. 1986;8(4):363-80.
48. Gratzke C, Bachmann A, Descazeaud A, Drake MJ, Madersbacher S, Mamoulakis C, et al. EAU Guidelines on the Assessment of Non-neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms including Benign Prostatic Obstruction. *Eur Urol*. 2015;67(6):1099-109.
49. Robert G, Descazeaud A, Nicolaiew N, Terry S, Sirab N, Vacherot F, et al. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: a 282 patients' immunohistochemical analysis. *Prostate*. 2009;69(16):1774-80.
50. Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(4):709-24.
51. Levine AC, Liu XH, Greenberg PD, Eliashvili M, Schiff JD, Aaronson SA, et al. Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology*. 1998;139(11):4672-8.

52. Alonso-Magdalena P, Brossner 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*. 2009;106(8):2859-63.
53. Wu Q, Shi J, Chen L, Wang CY, Park I, Lee C, et al. Regulation of proliferation and differentiation of prostatic stromal cells by oestradiol through prostatic epithelial cells in a paracrine manner. *BJU Int*. 2008;101(4):497-502.
54. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 2006;6:186.
55. Pullen M, Thomas K, Wu H, Nambi P. Stimulation of Hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor bb in human prostate smooth muscle cells. *Pharmacology*. 2001;62(2):103-6.
56. Eiro N, Fernandez-Gomez J, Sacristan 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*. 2017;143(2):351-9.
57. Izumi K, Li L, Chang C. Androgen receptor and immune inflammation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Clin Investig (Lond)*. 2014;4(10):935-50.
58. Ou Z, He Y, Qi L, Zu X, Wu L, Cao Z, et al. Infiltrating mast cells enhance benign prostatic hyperplasia through IL-6/STAT3/Cyclin D1 signals. *Oncotarget*. 2017;8(35):59156-64.
59. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
60. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
61. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol*. 2008;15(1):3866-71.
62. Grosclaude P, Roche L, Fuentes-Raspall R, Larranaga N, Group GE-W. Trends in net survival from prostate cancer in six European Latin countries: results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26 Trends in cancer net survival in six European Latin Countries: the SUDCAN study:S114-S20.
63. Thompson IM, Lucia MS, Tangen CM. Commentary: the ubiquity of prostate cancer: echoes of the past, implications for the present: "what has been will be again, what has been done will be done again; there is nothing new under the sun." *ECCLESIASTES 1:9*. *Int J Epidemiol*. 2007;36(2):287-9.
64. Eeles R, Ni Raghallaigh H. Men with a susceptibility to prostate cancer and the role of genetic based screening. *Transl Androl Urol*. 2018;7(1):61-9.
65. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007;18(3):581-92.
66. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quiros JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799-825.
67. Gelfond J, Choate K, Ankerst DP, Hernandez J, Leach RJ, Thompson IM, Jr. Intermediate-Term Risk of Prostate Cancer is Directly Related to Baseline Prostate Specific Antigen: Implications for Reducing the Burden of Prostate Specific Antigen Screening. *J Urol*. 2015;194(1):46-51.
68. Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol*. 2004;172(4 Pt 1):1297-301.

69. 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.* 2017;19(1):1-10.
70. Morote J, Celma A, Planas J, Placer J, Ferrer R, de Torres I, et al. Diagnostic accuracy of prostate health index to identify aggressive prostate cancer. An Institutional validation study. *Actas Urol Esp.* 2016;40(6):378-85.
71. Gnanapragasam VJ, Burling K, George A, Stearn S, Warren A, Barrett T, et al. The Prostate Health Index adds predictive value to multi-parametric MRI in detecting significant prostate cancers in a repeat biopsy population. *Sci Rep.* 2016;6:35364.
72. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJ, et al. Identification of a Candidate Gene Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(13):3061-70.
73. Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *Eur Urol.* 2016;70(5):740-8.
74. 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.* 2017;389(10071):815-22.
75. Hendriks RJ, van der Leest MMG, Dijkstra S, Barentsz JO, Van Criekinge W, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. A urinary biomarker-based risk score correlates with multiparametric MRI for prostate cancer detection. *Prostate.* 2017;77(14):1401-7.
76. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):244-52.
77. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, 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. *JAMA.* 1998;280(11):969-74.
78. Kronz JD, Allan CH, Shaikh AA, Epstein JI. Predicting cancer following a diagnosis of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy: data on men with more than one follow-up biopsy. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(8):1079-85.
79. 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.* 2007;99(4):775-9.
80. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. *Prostate.* 2012;72(11):1248-61.
81. Trujillo KA, Jones AC, Griffith JK, Bisoffi M. Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies. *Prostate Cancer.* 2012;2012:302894.
82. Henrique R, Jeronimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, et al. Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Mol Cancer Res.* 2006;4(1):1-8.

83. Zhou M, Tokumaru Y, Sidransky D, Epstein JI. Quantitative GSTP1 methylation levels correlate with Gleason grade and tumor volume in prostate needle biopsies. *J Urol*. 2004;171(6 Pt 1):2195-8.
84. Van Neste L, Partin AW, Stewart GD, Epstein JI, Harrison DJ, Van Criekinge W. Risk score predicts high-grade prostate cancer in DNA-methylation positive, histopathologically negative biopsies. *Prostate*. 2016;76(12):1078-87.
85. Wojno KJ, Costa FJ, Cornell RJ, Small JD, Pasin E, Van Criekinge W, et al. Reduced Rate of Repeated Prostate Biopsies Observed in ConfirmMDx Clinical Utility Field Study. *Am Health Drug Benefits*. 2014;7(3):129-34.
86. Taylor RA, Risbridger GP. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(6):490-7.
87. Rowley DR. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17(4):411-9.
88. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 2001;166(6):2472-83.
89. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650-9.
90. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003;200(4):429-47.
91. Ricciardelli C, Choong CS, Buchanan G, Vivekanandan S, Neufing P, Stahl J, et al. Androgen receptor levels in prostate cancer epithelial and peritumoral stromal cells identify non-organ confined disease. *Prostate*. 2005;63(1):19-28.
92. Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC, et al. Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(2):423-7.
93. Wikstrom 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*. 2007;67(12):1277-84.
94. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2017;71(4):618-29.
95. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*. 1999;59(4):803-6.
96. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487(7406):239-43.
97. Balk SP. Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology*. 2002;60(3 Suppl 1):132-8; discussion 8-9.
98. Dai C, Heemers H, Sharifi N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(9).
99. Mellinghoff IK, Vivanco I, Kwon A, Tran C, Wongvipat J, Sawyers CL. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell*. 2004;6(5):517-27.
100. Hornberg 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):e19059.

101. 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;69(1):16-22.

102. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009;69(6):2305-13.

103. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(12):701-11.

104. Gooren L. Androgen deficiency in the aging male: benefits and risks of androgen supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;85(2-5):349-55.

105. 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*. 2005;11(12):4512-20.

106. 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*. 1996;28(4):219-26.

107. Lu T, Burdelya LG, Swiatkowski SM, Boiko AD, Howe PH, Stark GR, et al. Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7112-7.

108. Niu YN, Xia SJ. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2009;11(1):28-35.

109. MacFarlane LA, Murphy PR. Regulation of FGF-2 by an endogenous antisense RNA: effects on cell adhesion and cell-cycle progression. *Mol Carcinog*. 2010;49(12):1031-44.

110. 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*. 2007;12(6):572-85.

111. Chu JH, Sun ZY, Meng XL, Wu JH, He GL, Liu GM, et al. Differential metastasis-associated gene analysis of prostate carcinoma cells derived from primary tumor and spontaneous lymphatic metastasis in nude mice with orthotopic implantation of PC-3M cells. *Cancer Lett*. 2006;233(1):79-88.

112. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(5):922-9.

113. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez 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*. 2011;29(5):657-63.

114. Xie T, Dong B, Yan Y, Hu G, Xu Y. Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. *Biomed Rep*. 2016;4(2):241-5.

115. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9.

116. Escaff S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez JM, et al. Comparative study of stromal metalloproteases expression in patients with benign hyperplasia and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(3):551-5.
117. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798-809.
118. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem*. 2005;95(3):497-505.
119. Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, et al. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchietomized mice. *Cancer Res*. 2006;66(6):3087-95.
120. Gomez Veiga F, Ponce Diaz-Reixa J, Pertega Diaz S, Martinez Breijo S, Gonzalez Dacal J, Andraca AZ, et al. [Impact of predictive models and decision making in prostate cancer: An integral debate]. *Arch Esp Urol*. 2011;64(8):765-82.
121. Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Reddi AH. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2002;277(6):4309-16.
122. de Billy E, Powers MV, Smith JR, Workman P. Drugging the heat shock factor 1 pathway: exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3806-8.
123. Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(1):46-58.
124. Gabai VL, Budagova KR, Sherman MY. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene*. 2005;24(20):3328-38.
125. Marrocco I, Altieri F, Rubini E, Paglia G, Chichiarelli S, Giamogante F, et al. Shmt2: A Stat3 Signaling New Player in Prostate Cancer Energy Metabolism. *Cells*. 2019;8(9).
126. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):736-46.
127. Dominska K, Kowalska K, Matysiak ZE, Pluciennik E, Ochedalski T, Piastowska-Ciesielska AW. Regulation of mRNA gene expression of members of the NF-kappaB transcription factor gene family by angiotensin II and relaxin 2 in normal and cancer prostate cell lines. *Mol Med Rep*. 2017;15(6):4352-9.
128. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
129. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2625-32.
130. Jin R, Sterling JA, Edwards JR, DeGraff DJ, Lee C, Park SI, et al. Activation of NF-kappa B signaling promotes growth of prostate cancer cells in bone. *PLoS One*. 2013;8(4):e60983.

131. Aggarwal S, Brennen WN, Kole TP, Schneider E, Topaloglu O, Yates M, et al. Fibroblast activation protein peptide substrates identified from human collagen I derived gelatin cleavage sites. *Biochemistry*. 2008;47(3):1076-86.
132. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate*. 1999;39(4):246-61.
133. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 2005;106(9):3020-7.
134. Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, et al. Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res*. 2010;70(11):4580-9.
135. Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, et al. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res*. 2008;6(8):1259-67.
136. Augsten M, Sjoberg E, Frings O, Vorrink SU, Frijhoff J, Olsson E, et al. Cancer-associated fibroblasts expressing CXCL14 rely upon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties. *Cancer Res*. 2014;74(11):2999-3010.
137. Gu XL, Ou ZL, Lin FJ, Yang XL, Luo JM, Shen ZZ, et al. Expression of CXCL14 and its anticancer role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(3):725-35.
138. Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomed Res*. 2009;30(5):315-8.
139. Allinen M, Beroukhir R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004;6(1):17-32.
140. Augsten M, Hagglof C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, et al. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3414-9.
141. Hara T, Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J Biochem*. 2012;151(5):469-76.
142. 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*. 2001;20(55):8036-41.
143. Rhim JS. In vitro human cell culture models for the study of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2000;3(4):229-35.
144. Arnold JT, Isaacs JT. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer*. 2002;9(1):61-73.
145. Stock D, Groome PA, Siemens DR. Inflammation and prostate cancer: a future target for prevention and therapy? *Urol Clin North Am*. 2008;35(1):117-30; vii.
146. Shariat SF, Scherr DS, Gupta A, Bianco FJ, Jr., Karakiewicz PI, Zeltser IS, et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Arch Esp Urol*. 2011;64(8):681-94.
147. Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol*. 2007;210(1):111-21.

148. Stamey TA, Caldwell MC, Fan Z, Zhang Z, McNeal JE, Nolley R, et al. Genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancer: which is the best prostatic control tissue? *J Urol.* 2003;170(6 Pt 1):2263-8.
149. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;71(4):630-42.
150. Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65(4):965-74.
151. 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.* 2008;179(2):754-8.
152. Torrealba N, Vera R, Fraile B, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Royuela M. TGF-beta/PI3K/AKT/mTOR/NF-kB pathway. Clinicopathological features in prostate cancer. *Aging Male.* 2019:1-11.
153. Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, et al. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1714-23.
154. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol.* 2017;39(2):131-7.
155. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008;68(4):989-97.
156. Lee YC, Bilen MA, Yu G, Lin SC, Huang CF, Ortiz A, et al. Inhibition of cell adhesion by a cadherin-11 antibody thwarts bone metastasis. *Mol Cancer Res.* 2013;11(11):1401-11.
157. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet.* 2015;47(7):736-45.
158. Ropiquet F, Giri D, Lamb DJ, Ittmann M. FGF7 and FGF2 are increased in benign prostatic hyperplasia and are associated with increased proliferation. *J Urol.* 1999;162(2):595-9.
159. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeegan 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.* 1993;13(8):4513-22.
160. Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J.* 2011;437(2):199-213.
161. Lu W, Luo Y, Kan M, McKeegan WL. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12827-34.
162. Clayton NS, Grose RP. Emerging Roles of Fibroblast Growth Factor 10 in Cancer. *Front Genet.* 2018;9:499.
163. Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Schmidt K, Ittmann M. FGF-10 is expressed at low levels in the human prostate. *Prostate.* 2000;44(4):334-8.

164. 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. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
165. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.
166. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 1):111-8.
167. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RA, Jr., Kallakury BV. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol*. 2003;16(3):198-205.
168. Jones JL, Walker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol*. 1997;183(4):377-9.
169. Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*. 2007;96(6):903-11.
170. 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;96(1):21-30.
171. Gilardoni MB, Remedi MM, Oviedo M, Dellavedova T, Sarria JP, Racca L, et al. Differential expression of Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in prostate gland: From normal to malignant lesions. *Pathol Res Pract*. 2017;213(1):66-71.
172. 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*. 2018;24(1):34.
173. Masson R, Lefebvre O, Noel A, Fahime ME, 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*. 1998;140(6):1535-41.
174. 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 Pac J Cancer Prev*. 2013;14(5):3331-5.
175. Steenkamp V, Gouws MC, Gulumian M, Elgorashi EE, van Staden J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(1):71-5.
176. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256-69.
177. Deuel TF. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Annu Rev Cell Biol*. 1987;3:443-92.
178. 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*. 1995;92(21):9881-5.

179. 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.* 1993;52(4):404-13.
180. Brennen WN, Rosen DM, Chaux A, Netto GJ, Isaacs JT, Denmeade SR. Pharmacokinetics and toxicology of a fibroblast activation protein (FAP)-activated prodrug in murine xenograft models of human cancer. *Prostate.* 2014;74(13):1308-19.
181. Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol.* 1999;161(1):182-7.
182. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 2014;113(6):986-92.
183. Shariat SF, Andrews B, Kattan MW, Kim J, Wheeler TM, Slawin KM. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology.* 2001;58(6):1008-15.
184. George DJ, Halabi S, Shepard TF, Sanford B, Vogelzang NJ, Small EJ, et al. The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480. *Clin Cancer Res.* 2005;11(5):1815-20.
185. Bjork JK, Ahonen I, Mirtti T, Erickson A, Rannikko A, Butzow A, et al. Increased HSF1 expression predicts shorter disease-specific survival of prostate cancer patients following radical prostatectomy. *Oncotarget.* 2018;9(58):31200-13.
186. Yang L, Wang Y, Zhang Q, Lai Y, Li C, Zhang Q, et al. Identification of Hsf1 as a novel androgen receptor-regulated gene in mouse Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(6):514-23.
187. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell.* 2010;40(2):253-66.
188. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 2005;10(2):86-103.
189. Teng Y, Ngoka L, Mei Y, Lesoon L, Cowell JK. HSP90 and HSP70 proteins are essential for stabilization and activation of WASF3 metastasis-promoting protein. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10051-9.
190. He S, Zhang C, Shafi AA, Sequeira M, Acquaviva J, Friedland JC, et al. Potent activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib in prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status or variant receptor expression. *Int J Oncol.* 2013;42(1):35-43.
191. Dong J, Wu Z, Wang D, Pascal LE, Nelson JB, Wipf P, et al. Hsp70 Binds to the Androgen Receptor N-terminal Domain and Modulates the Receptor Function in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(1):39-50.
192. Jung ME, Ouk S, Yoo D, Sawyers CL, Chen C, Tran C, et al. Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Med Chem.* 2010;53(7):2779-96.
193. Lawrence MG, Obinata D, Sandhu S, Selth LA, Wong SQ, Porter LH, et al. Patient-derived Models of Abiraterone- and Enzalutamide-resistant Prostate Cancer Reveal Sensitivity to Ribosome-directed Therapy. *Eur Urol.* 2018;74(5):562-72.

194. Kita K, Shiota M, Tanaka M, Otsuka A, Matsumoto M, Kato M, et al. Heat shock protein 70 inhibitors suppress androgen receptor expression in LNCaP95 prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1820-7.
195. Propper DJ, Braybrooke JP, Taylor DJ, Lodi R, Styles P, Cramer JA, et al. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT077 in chemo-resistant solid tumours. *Ann Oncol.* 1999;10(8):923-7.
196. Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells. *Cell Biol Int.* 2004;28(5):361-71.
197. Martin TA, Mason MD, Jiang WG. HGF and the regulation of tight junctions in human prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2014;32(1):213-24.
198. Dayyani F, Zurita AJ, Nogueras-Gonzalez 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.* 2016;16:721.
199. Lee YC, Cheng CJ, Huang M, Bilen MA, Ye X, Navone NM, et al. Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. *J Pathol.* 2010;221(1):68-76.
200. Carreras-Puigvert J, Zitnik M, Jemth AS, Carter M, Unterlass JE, Hallstrom B, et al. A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nat Commun.* 2017;8(1):1541.
201. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 2002;62(6):1832-7.
202. Kasina S, Macoska JA. The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(2):249-63.
203. Ray P, Stacer AC, Fenner J, Cavnar SP, Meguiar K, Brown M, et al. CXCL12-gamma in primary tumors drives breast cancer metastasis. *Oncogene.* 2015;34(16):2043-51.
204. Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, et al. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 1998;58(20):4640-5.
205. Lee SO, Lou W, Hou M, de Miguel F, Gerber L, Gao AC. Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):370-6.
206. Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, Codony-Servat J, Bosch M, Filella X, et al. Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5578-86.
207. Kampan NC, Xiang SD, McNally OM, Stephens AN, Quinn MA, Plebanski M. Immunotherapeutic Interleukin-6 or Interleukin-6 Receptor Blockade in Cancer: Challenges and Opportunities. *Curr Med Chem.* 2018;25(36):4785-806.
208. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):378-87.
209. Kang M, Lee KH, Lee HS, Jeong CW, Ku JH, Kim HH, et al. Concurrent treatment with simvastatin and NF-kappaB inhibitor in human castration-resistant prostate

cancer cells exerts synergistic anti-cancer effects via control of the NF-kappaB/LIN28/let-7 miRNA signaling pathway. PLoS One. 2017;12(9):e0184644.

210. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF-kappa B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. Neoplasia. 2017;19(4):333-45.

211. 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. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13(5):759-64.

*Anexos*

---



## Anexo 1

**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. ....

*REVOCACIÓN*

D/D<sup>a</sup> .....

de ..... años de edad, con domicilio en ....., y D.N.I. nº .....

D/D<sup>a</sup> .....

de..... años de edad, con domicilio en ....., y D.N.I. nº .....

en calidad de ..... (representante legal, familiar o allegado)

Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... y no deseo que con mi muestra del tumor se continúe con el procedimiento del que se me ha informado, que doy en esta fecha por finalizado.

En .....(lugar y fecha).

Firma del paciente

Firma del médico



## Anexo 2

**Comparación de la expresión génica de los factores entre todos los grupos.** No todos presentan diferencias estadísticamente significativas. RA: Receptor androgénico; NUDT6: Nudix hidrolasa 6; FGF7: Factor de crecimiento de fibroblastos 7; FGF10: Factor de crecimiento de fibroblastos 10; TGFβ-1: Factor de crecimiento transformante B1; HGF: Factor de crecimiento hepatocítico; PDGFβ: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, subunidad b; MMP-2: Metaloproteínasa 2; MMP-9: Metaloproteínasa 9; MMP-11: Metaloproteínasa 11; IL-6: Interleuquina 6; IL-17RB: Receptor B de Interleuquina 17; HSF-1: Factor de transcripción de choque térmico 1; HSPA1A: Proteína de shock térmico; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3; FAP: Proteína activadora de fibroblastos; CDH11: Cadherina 11; CXCL12: Factor derivado de célula estromal-1; CXCL14: C-X-C Ligando de quimioquina 14; NAF: fibroblastos de tejido normal; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; 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.

