

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

**Respuesta inflamatoria e interacción
estroma-epitelio en los cultivos de
fibroblastos peritumorales
procedentes de muestras de cáncer de
próstata humano**

TESIS DOCTORAL

Jorge Manuel González Suárez

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: CIENCIAS DE LA SALUD



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

Respuesta inflamatoria e interacción
estroma-epitelio en los cultivos de
fibroblastos peritumorales
procedentes de muestras de cáncer de
próstata humano

TESIS DOCTORAL

Jorge Manuel González Suárez



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Respuesta inflamatoria e interacción estroma-epitelio en los cultivos de fibroblastos peritumorales procedentes de muestras de cáncer de próstata humano	Inflammatory response and stroma-epithelium interaction in peritumoral fibroblast cultures from human prostate cancer specimens

2.- Autor	
JORGE MANUEL GONZÁLEZ SUÁREZ	DNI: _____
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN

En la actualidad supone un reto diagnosticar y tratar de forma individualizada muchos tumores prostáticos. Cada vez son más las opciones terapéuticas y las técnicas de tratamiento multimodal; sin embargo, necesitamos nuevos biomarcadores que nos ayuden para la elección terapéutica más adecuada en cada paciente. Las interacciones entre las células tumorales y el estroma asociado influyen en el inicio, la progresión y el pronóstico del paciente, dejando cada vez más claro que el compartimento estromal es importante para la oncogénesis y la progresión tumoral; de ello se deduce que el desarrollo de marcadores de pronóstico y dianas terapéuticas en el compartimento estromal es una posibilidad clara para el futuro. El objetivo de este trabajo se basó precisamente en el estudio de determinados factores del estroma prostático en el cáncer de próstata con el fin de encontrar posibles marcadores diagnósticos, pronósticos y dianas terapéuticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un estudio de obtención de muestras prospectivo donde se analiza tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata. Se recogieron muestras de los diferentes grupos pronósticos dentro de los tumores localizados, así como muestras de pacientes metastásicos sin haber iniciado tratamiento de privación androgénica. Se compararon los resultados con los de las muestras no tumorales alejadas del tumor (control sano). Tras obtener las muestras mediante biopsia transrectal de próstata se enviaron al laboratorio para cultivar y aislar los fibroblastos en los que realizamos análisis de distintos marcadores moleculares con intención de comparar su valor en los diferentes grupos de pacientes. Los 10 factores derivados del estroma analizados son marcadores de inflamación (**IL-6**, **IL-17RB**, **STAT3**, **NFκβ1**, **HSF1** y **HSPA1A**) y proteínas implicadas en la interacción epitelio-estroma (**CDH11**, **FAP**, **CXCL12** y **CXCL14**). El seguimiento se realizó en la consulta de Urología según los protocolos correspondientes a las guías europeas. Realizamos estudios estadísticos para evaluar las diferencias de



expresión en función del grado tumoral, estadio, localizado o metastásico, comparándolos a su vez con el tejido normal, también analizamos si existen correlaciones entre la expresión de marcadores entre sí, y por último, la relación con el tiempo libre de supervivencia.

RESULTADOS

Se analizaron 45 muestras de 30 pacientes con CaP sometidas a biopsia transrectal. De los 30 casos, 24 tumores fueron localizados y 6 metastásicos. De los pacientes con tumores localizados se tomaron 15 muestras periféricas al tumor como grupo control de tejido normal. Se objetivó que, a mayor estadio tumoral, menor expresión de **CXCL14**, así mismo, a mayor Gleason se produce una disminución de la expresión de **CDH11** e **IL-6**. En cuanto a la expresión en tejido normal frente al tumoral se observó en ambos tipos tumorales, aumento de **IL-6** y disminución de **IL-17RB**. En el análisis de tiempo libre de enfermedad en los tumores localizados, en el estudio univariable resultaron significativos **CXCL12**, **FAP** y **NFkB1**; en el análisis de regresión de Cox **CXCL12** en el estroma del tumor en la biopsia fue el único factor que resultó independiente para recidiva bioquímica tras prostatectomía. Cuando se realizó el estudio multivariable con los datos de la pieza de prostatectomía y los factores estromales significativos en el estudio univariable sólo resultaron factores independientes de recidiva la sobreexpresión de **CXCL12** y **NFkB1**.

CONCLUSIONES

De estos resultados deducimos que la falta de correlación entre el **PSA** y la sobreexpresión de los marcadores estudiados indicaría que la carcinogénesis en el estroma es independiente de andrógenos; además que tanto **CXCL12**, **NFkB1** y **FAP** son posibles marcadores pronósticos. Así mismo se plantea **CXCL12** como una potencial diana terapéutica antagonizando su receptor. Aunque para todo ello se precisan más estudios con mayor número de pacientes que consigan confirmar nuestros resultados.

RESUMEN (en inglés)

INTRODUCTION

It is currently a challenge to diagnose and treat many prostate tumors individually. There are more and more therapeutic options and multimodal treatment techniques; however, we need new biomarkers to help us for the most appropriate therapeutic choice in each patient. Interactions between tumor cells and associated stroma influence the patient's onset, progression, and prognosis, making it increasingly clear that the stromal compartment is important for oncogenesis and tumor progression; It follows that the development of prognostic markers and therapeutic targets in the stromal compartment is a clear possibility for the future. The aim of this work was based precisely on the study of certain prostate stromal factors in prostate cancer in order to find possible diagnostic markers, prognostic and therapeutic targets.



MATERIALS AND METHODS

A prospective study is performed to analyze prostate tissue in patients with prostate cancer. Specimens were collected from the different prognostic groups within the localized tumors, as well as samples from metastatic patients without having started androgen deprivation treatment. The results were compared with those of nontumor samples away from the tumor (control). After obtaining the specimens by transrectal prostate biopsy, they were sent to the laboratory to cultivate and isolate the fibroblasts in which we performed analyses of different molecular markers with the intention of comparing their value in the different groups of patients. The 10 stromal-derived factors analyzed are inflammation markers (IL-6, IL-17RB, STAT3, NF κ B1, HSF1 and HSPA1A) and proteins involved in epithelial-stromal interaction (CDH11, FAP, CXCL12 and CXCL14). The follow-up was carried out at the Urology consultation according to the protocols corresponding to the European guides. We conducted statistical studies to evaluate the differences in expression according to tumor grade, stage, localized or metastatic, comparing them with normal tissue, we also analyzed if there are correlations between the expression of markers, and finally, the relationship with time-free survival.

RESULTS

We analyzed 45 specimens from 30 patients with CaP who underwent transrectal biopsy. From 30 cases, 24 tumors were located and 6 metastatic. From patients with localized tumors, 15 specimens were taken away from the tumor, in peripheral areas, as a normal tissue control group. It was observed that the higher tumor stage, the lower expression of CXCL14, and the higher Gleason, the lower expression of CDH11 and IL-6. In terms of normal tissue expression versus tumour, it was observed in both tumor types, increase in IL-6 and decrease in IL-17RB. In the analysis of disease-free time in localized tumors, in the univariate study, CXCL12, FAP and NF κ B1 were significant; in the Cox regression analysis, CXCL12 in the tumor stroma from biopsy it was the only independent factor for biochemical recurrence after prostatectomy. When multivariate study was performed with prostatectomy piece data and significant stromal factors in the univariate study, only the overexpression of CXCL12 and NF κ B1 was independent of recurrence.

CONCLUSIONS

Therefore, our findings led us to consider that the absence of correlation between PSA and overexpression of the studied markers would indicate that carcinogenesis in the stroma is independent of androgens; moreover, both CXCL12, NF κ B1 and FAP are possible prognostic markers. CXCL12 is also proposed as a therapeutic target potential antagonizing its receptor. Further studies will be necessary to assess our results.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que han hecho posible que hoy esta tesis doctoral sea una realidad:

En primer lugar, a mi director, el **Dr. Jesús M. Fernández**, por su propuesta de trabajo, por su esfuerzo para poder realizarlo, por buscar las ayudas necesarias para ponerme en las manos todos los medios y, sobre todo, por tu paciencia infinita Jesús, cualquiera en tu lugar hubiese abandonado... GRACIAS.

A mi otro director, **Dr. Safwan Escaf**, por creer siempre en mí y por su disponibilidad inmediata para todo lo que pudiese necesitar.

A todas las personas que han contribuido para que este trabajo pudiera realizarse, en especial al Hospital de Jove y sobre todo a la **Dra. Noemí Eiro**, haciendo ciencia y “magia” en su laboratorio.

A **Adán**, por soportarme, apoyarme, ayudarme, y por leerse todo varias veces para detectar esos pequeños detalles en los que a veces los más técnicos y científicos no reparamos.

A mis padres, **Águeda y Jorge**, sin vosotros nada de esto hubiese sido posible, pero sí, habéis conseguido que llegue a lo imposible.

Dejo para el final el agradecimiento más importante, el más especial, y, a su vez, el que resulta imposible describir con palabras. GRACIAS por creer en mí mucho más que yo mismo, por ayudarme altruistamente sin descanso y sufriendo mis frustraciones (no sé cómo me soportas). Eres lo que correspondería a tener la mejor hermana del mundo siendo hijo único. GRACIAS **Beatriz Lobo**, sin ti no hubiese logrado nada de esto, pero sobre todo sin ti el mundo sería mucho más oscuro.

GRACIAS

ÍNDICE

Índice	I
Índice de Tablas	V
Índice de Figuras	VI
Abreviaturas	VIII
1.Introducción	1
1.1 La dimensión del cáncer de próstata.....	3
1.1.1 Incidencia y mortalidad.....	3
1.1.2 Problema de falta de marcadores fiables. Cribado y diagnóstico.....	4
1.1.3 Imágenes de próstata.....	6
1.1.4 Imágenes de PET/CT de antígeno de membrana específico de próstata(PSMA PET/CT).....	7
1.1.5 Biopsia prostática.....	8
1.2 Tratamiento del Cáncer de próstata.....	9
1.2.1 Vigilancia activa.....	9
1.2.2 Tratamiento en la enfermedad localizada.....	9
1.2.3 Tratamiento en la enfermedad metastásica.....	10
1.3 Valoración del pronóstico del cáncer de próstata.....	10
1.3.1 Otros marcadores tisulares.....	10
1.4 Importancia del estroma en la carcinogénesis y transformación hacia el estroma activado.....	12
1.5 Cultivos celulares para el estudio de fibroblastos del estroma prostático.....	16
1.6 Marcadores de interacción estroma-epitelio.....	18
1.6.1 Cadherina 11 (CDH11).....	18
1.6.2 CXC Ligando de la quimiocina 14 (CXCL14).....	21
1.6.3 Factor 1 derivado de células estromales (CXCL12/SDF1).....	24

1.6.4 Proteína activadora de fibroblastos (FAP).....	28
1.7 Marcadores de inflamación, de localización preferentemente estromal.....	31
1.7.1 Interleucina 6 (IL-6).....	31
1.7.2 Receptor de Interleucina 17 (IL-17R).....	35
1.7.3 NFκβ1	38
1.7.4 STAT3	42
1.7.5 Factor de choque térmico 1 (HSF-1).....	45
1.7.6 Hsp72/HSPA1A.....	48
2. Hipótesis.....	52
3. Objetivos.....	56
4. Material y métodos.....	59
4.1 Diseño del estudio.....	61
4.1.1 Población de estudio.....	61
4.1.2 Métodos de obtención de muestras.....	62
4.1.3 Selección de las muestras válidas para el estudio.....	63
4.1.4 Obtención de los datos clínicos.....	64
4.2 Técnica del cultivo de fibroblastos.....	64
4.2.1 Determinaciones moleculares.....	65
4.2.2 Aspectos éticos y de confidencialidad.....	66
4.2.3 Estudio estadístico.....	67

5. Resultados	68
5.1 Características de la Serie.....	70
5.2 Determinación de marcadores.....	73
5.2.1 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata localizado.....	74
5.2.2 Correlación en la expresión de los diferentes marcadores estudiados.....	76
5.2.3 Relación de la expresión de los marcadores en tejido tumoral y no tumoral.....	78
5.2.4 Expresión de marcadores de fibroblastos de tejido normal y de cáncer de próstata metastásico.....	79
5.3 Análisis de tiempo libre de enfermedad en los tumores localizados.....	80
6. Discusión	83
6.1 Correlación entre la expresión de los factores a estudio y el PSA.....	87
6.2 Correlación entre los factores estromales y las características tumorales en la muestra de biopsia prostática.....	88
6.3 Correlación entre la expresión de los diferentes factores.....	90
6.4 Estudio de expresión de los marcadores en los tumores metastásicos.....	91
6.5 Relación en la expresión con el tiempo libre de enfermedad en el cáncer de próstata localizado.....	92
6.6 Limitaciones.....	95

7. Conclusiones	97
8. Significado de nuestros resultados	101
9. Bibliografía	105
10. Anexos	133
10.1 Anexo I	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de Gleason modificado de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) 2014.....	8
Tabla 2. Distribución del Score Gleason en los tumores localizados de la serie.....	70
Tabla 3. Concordancia entre los resultados de la biopsia y la pieza de prostatectomía....	71
Tabla 4. Distribución de casos según la ISUP.....	72
Tabla 5. Estadios pT, de las piezas de prostatectomía.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares de la glándula prostática humana.....	13
Figura 2. Interacción estroma-epitelio en la progresión del cáncer de próstata.....	15
Figura 3. Roles propuestos a CXCL14 durante la carcinogénesis.....	24
Figura 4. Papel pleiotrópico del eje SDF1/CXCR4 en la metástasis ósea del CaP.....	26
Figura 5. Interacción de FAP en el microambiente tumoral.....	29
Figura 6. Obtención de muestras pareadas para el diagnóstico y para nuestro estudio.....	62
Figura 7. Imágenes de los cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento.....	65
Figura 8. Expresión de CXCL14 en los CAF tumorales con relación al estadio pT.....	74
Figura 9. Correlación entre el Gleason y la expresión de CDH11.....	75
Figura 10. Correlación entre el Gleason y la expresión de IL6.....	75
Figura 11. Correlaciones entre la expresión de CDH11 y NFKB1, CXCL14, IL6 y STAT3.....	76
Figura 12. Correlación entre el aumento de CXCL12 y HSF1.....	77

Figura 13. Correlación entre el aumento de expresión de CXCL14 con IL6 y STAT3.....	77
Figura 14. Correlaciones positivas entre HSPA1A con HSF1 e IL6 con STAT3.....	77
Figura 15. Correlación inversa entre la expresión HSPA1A y FAP.....	78
Figura 16. Aumento de expresión de IL6 en fibroblastos peritumorales.....	78
Figura 17. Disminución de la expresión de IL17RB en tumores primarios.....	79
Figura 18. Expresión de IL6 e IL17RB, en tumores metastásicos.....	80
Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad, en función de la expresión alta o bajo de CXCL12 y NFkB1.....	81
Figura 20. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de FAP.....	82

ABREVIATURAS

α-SMA	Isoforma α actina de musculo liso
AKT	Vías de señalización intracelular
ARF-p53	Mediadores del control celular
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer de próstata
CaP	Cáncer de próstata
CCL2	Proteína de activación vía STAT3-CCL2
CD	Células dendríticas
CDH11	Cadherina 11
CPL	Cáncer de próstata localizado
CPM+	Cáncer de próstata metastásico
CPRC	Cáncer de próstata resistente a la castración
cT	Estadio clínico T
CXCL12/SDF1	Factor derivado de células estromales 1
CXCL14	CXC Ligando de la quimiocina 14
DKK3	Factores promotores de tumores
DU145	Líneas celulares de Cáncer de próstata para estudio en cultivos
EC	Dominio extracelular
EPI	ExoDx Prostate Intelliscore
FAP	Factor activador de fibroblastos
FDA	Food and drug administration
FG	Factores de crecimiento

FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos 1
GCSF	Factor estimulante de granulocitos
GPS	Puntuación de próstata genómica
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HGF	Factor de crecimiento hepatocítico
HIF	Factor inducido por hipoxia
HSF-1	Factor de transcripción de choque térmico 1
HSP	Proteínas de choque térmico
HSPA1A	Proteínas de choque térmico de 70 KDa
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
IL-17RB	Receptor de la interleucina 17
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
JAK	Familia de tirosina cinasa Janus
LNCaP	Líneas celulares de cáncer de próstata para cultivos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP-9	Metaloproteinasa de Matriz 9
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
m-TOR	Vías de señalización intracelular
NCCN	National Comprehensive Cáncer Network
NE	Diferenciación neuroendocrina
NFkβ1	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B

NK	Células natural killer
PC3	Líneas celulares de Cáncer de próstata para estudio en cultivo
PCA3	Antígeno 3 del cáncer de próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
PHI	Índice de salud de la próstata
PI3K	Vía activación intracelular, Fosfoinositido-3-quinasa
PIA	Atrofia inflamatoria proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PIRADS	Prostate Imaging – Reporting and Data System
PKA	Proteína cinasa A implicada en la transducción de señales
pN	Estadio de afectación ganglionar
PR	Prostatectomía radical
PRL-3	Fosfatasa 3 del hígado en regeneración
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno de membrana específico de próstata
pT	Estadio patológico T
PTEN	Gen y enzima supresor de tumores
RA	Receptor androgénico
RAS	Nombre de oncogén
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RMmp	Resonancia magnética multiparamétrica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Radioterapia

SRC-1	Coactivador del Receptor de esteroides 1
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
TC	Tomografía computarizada
TDA	Terapia de privación androgénica
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TME	Transformación epitelial a mesenquimal
TRUS	Ecografía transrectal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPN	Valor predictivo negativo
Wnt	Vía de señalización

1. Introducción

1.1 LA DIMENSIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (CaP) es la neoplasia maligna masculina más comúnmente diagnosticada y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en los hombres en el mundo. En 2018 esto ascendió a 1.280.000 casos recién diagnosticados y 359.000 muertes en todo el mundo a causa de esta enfermedad (1). Afortunadamente, la mayoría de los cánceres de próstata tienden a crecer lentamente y son de bajo grado con un riesgo relativamente bajo y agresividad limitada (2). Cuando el cáncer se limita a la próstata, se considera localizado y potencialmente curable (3); no obstante, si la enfermedad se ha extendido a otro lugar fuera de la próstata los resultados dependen de la edad, los problemas de salud asociados, la histología del tumor y la extensión del cáncer (4).

No hay síntomas iniciales o tempranos en la mayoría de los casos y el diagnóstico se basa principalmente en pruebas de antígeno prostático específico (PSA) y biopsias de tejido prostático guiadas por ecografía transrectal (TRUS), aunque las pruebas de PSA para detección siguen siendo controvertidas (5).

1.1.1 Incidencia y mortalidad

Las tasas de incidencia (por cada 100.000 habitantes) varían en casi 50 veces en todo el mundo, desde 3,9 en la India hasta 178,8 en los afroamericanos de EE.UU. Generalmente, las tasas más altas se registran en América del Norte, Oceanía y Europa del Norte y Occidental, mientras que las tasas más bajas se encuentran en Asia y África del Norte. Gran parte de las variaciones internacionales en las tasas de incidencia de cáncer de próstata reflejan diferencias en el uso de la prueba del PSA, que detecta casos de cáncer de próstata indolente que de otro modo no se hubieran detectado en la vida (6). Según estimaciones recientes, entre el 23% y el 42% de los casos de cáncer de próstata en Europa y Estados Unidos podrían deberse a un sobrediagnóstico mediante pruebas de PSA (7). Las tasas de mortalidad relativamente bajas en los blancos estadounidenses y en algunos países europeos, donde las pruebas de PSA son comunes, también pueden respaldar el papel del sobrediagnóstico en las altas tasas de incidencia en estos países (8).

Las tasas de incidencia en los Estados Unidos, Canadá y Australia en general están disminuyendo después de aumentar drásticamente entre fines de la década de 1980 y principios de la de 1990 debido a la rápida difusión de las pruebas de PSA, mientras que

las tasas en el Reino Unido y en otras partes de Europa continúan aumentando levemente debido a una mayor conciencia y adopción gradual de las pruebas de PSA (6). En contraste con la incidencia del cáncer de próstata y las tendencias de mortalidad en los países occidentales, las tasas están aumentando en algunos países de Asia y Europa del Este, como Japón, Singapur y Polonia, donde la prueba de PSA no se usa comúnmente. Se cree que el aumento en estos países refleja la occidentalización, incluido el aumento del consumo de grasa animal, la obesidad y la inactividad física (6).

En España, la incidencia es de unos 77 casos por 100.000 varones, siendo la media Europea de 86, y de 106 si se trata de los 25 Estados miembro de la unión Europea (9). En el año 2015, según los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), fue el tumor más frecuente en hombres con 33.370 casos, así como en el año 2014 se describe una tasa de mortalidad de 15,23 por 100.000 varones, en descenso en los últimos años (10).

Las tasas de mortalidad por cáncer de próstata han disminuido en la mayoría de los países occidentales (6). La razón de esto no está clara, pero puede reflejar tanto un tratamiento mejorado como una detección temprana (11). Sobre este tema existen controversias ya que un ensayo aleatorizado reciente en los Estados Unidos no pudo demostrar el beneficio de las pruebas de PSA para reducir las muertes por cáncer de próstata (12), frente a otro ensayo en Europa que sí demostró un beneficio (13).

1.1.2 Problema de falta de marcadores fiables. Cribado y diagnóstico

Los niveles elevados de PSA (generalmente superiores a 4 ng/ml) en la sangre es la forma en que el 80% de los cánceres de próstata se presentan inicialmente, aunque los niveles elevados de PSA por sí solos identifican correctamente el cáncer de próstata solo entre el 25% y el 30% de las veces. Recomendamos al menos 2 niveles anormales de PSA o la presencia de un nódulo palpable en el tacto rectal para justificar una biopsia y una mayor investigación (14).

El valor de las pruebas de detección de PSA sigue siendo controvertido debido a las preocupaciones del sobrediagnóstico, de las complicaciones de “biopsias innecesarias”, del posible sobretreatmento de los cánceres de bajo riesgo así como del “limitado” beneficio real en la supervivencia ante un diagnóstico y tratamiento temprano (15). Para

evitar esto, se debe seleccionar de manera más precisa a los pacientes que se beneficiarán de una biopsia de próstata y evitar así sobrediagnósticos y sobretratamientos, por ello en la actualidad están disponibles muchas pruebas de detección prebiopsia alternativas (16):

PSA libre y total: el porcentaje de PSA libre en la sangre puede ser un indicador útil de malignidad. Si el PSA total está entre 4 y 10 ng/ml, se considera válido un porcentaje de PSA libre. El porcentaje de PSA libre se calcula multiplicando el nivel de PSA libre por 100 y dividiendo por el valor total de PSA.

Las estimaciones de riesgo reales variarán según el grupo de edad, pero como guía general:

- Si el porcentaje de PSA libre es superior al 25%, el riesgo de cáncer es inferior al 10%.
- Si el porcentaje de PSA libre es inferior al 10%, el riesgo de cáncer es de aproximadamente el 50%.

La **densidad de PSA** es el PSA total dividido por el volumen prostático determinado por resonancia magnética o ecografía. La densidad de PSA está destinada a minimizar el efecto del agrandamiento prostático benigno. En general, si la densidad de PSA es superior a 0,15, se considera sugestivo de malignidad (17)

La **Velocidad de PSA** compara los niveles séricos anuales de PSA. Un aumento anual de PSA superior a 0,75 ng/ml o superior al 25% sugiere un posible cáncer de próstata (18).

El **antígeno 3 del cáncer de próstata (PCA3)** es una prueba genética basada en ARN que se realiza a partir de una muestra de orina obtenida inmediatamente después de un masaje prostático. Si el PCA3 está elevado, sugiere la presencia de cáncer de próstata. Su resultado es más fiable que el PSA ya que es independiente del volumen de la próstata. El PCA3 se utiliza mejor para determinar la necesidad de repetir la biopsia después de la histología inicial negativa (19).

El **índice de salud de la próstata (PHI)** es un análisis de sangre que incluye el PSA libre, el PSA total y la isoforma [-2] proPSA del PSA libre. Se utiliza una fórmula para combinar matemáticamente los resultados de estas pruebas para obtener la puntuación de PHI. Esta puntuación de PHI parece ser superior al PSA, PSA libre y total y PCA3 para predecir la presencia de cáncer de próstata (20).

La prueba “**4K-score**” mide el PSA total en suero, el PSA libre, el PSA intacto y el antígeno 2 de calicreína humana e incluye resultados clínicos (edad, tacto rectal e historia previa). Mediante un algoritmo se determina la probabilidad de padecer CaP de alto riesgo. Debido a su rentabilidad, este test está incluido en las actuales guías de “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN) para la detección precoz de CaP (21). Curiosamente, no se ha demostrado que la prueba “4K” sea mejor que la prueba de PSA sola, cuando se usa para rastrear pacientes de vigilancia activa (22).

“**ExoDx Prostate Intelliscore (EPI)**”: la prueba analiza el ARN exosómico en busca de tres biomarcadores que se sabe que se expresan en la orina de hombres con cáncer de próstata de alto grado. Posteriormente, se utiliza un algoritmo patentado para asignar una puntuación de riesgo que predice la presencia de cáncer de próstata de alto grado (puntuación de Gleason = 7 o superior; o cualquier grado de Gleason = 4 o 5). A diferencia de otras pruebas de orina para el cáncer de próstata, no se requiere un tacto rectal ni un masaje prostático. El valor predictivo negativo es del 91,3% con un índice de sensibilidad del 91,9% (23)

En general, las pruebas predictivas que incluyen variables clínicas se consideran algo más fiables que aquellas pruebas que no lo hacen (24)

1.1.3 Imágenes de próstata

La ecografía y la resonancia magnética son las principales modalidades de imagen utilizadas para la detección y el diagnóstico inicial del cáncer de próstata. La ecografía transrectal (TRUS, por sus siglas en inglés) es una prueba poco fiable para determinar la malignidad de una lesión (25).

La resonancia magnética multiparamétrica (RMmp) de próstata tiene una resolución de tejido blando mucho mejor que la ecografía y puede identificar áreas de la glándula que son realmente “sospechosas” con un alto grado de precisión y fiabilidad (valor predictivo positivo superior al 90%), se está convirtiendo en una modalidad de imagen estándar para el diagnóstico de cáncer de próstata debido a que puede identificar y clasificar los nódulos prostáticos sospechosos para ayudar con la estadificación y la localización, verificar la extensión extracapsular, evaluar las vesículas seminales en busca de una posible participación tumoral y determinar el agrandamiento de los ganglios linfáticos regionales

que podrían indicar una enfermedad metastásica temprana. Además, se puede aumentar la rentabilidad diagnóstica de la biopsia de próstata realizando disparos dirigidos por fusión de imagen sobre los focos sospechosos, si bien, uno de los problemas de este sistema es la escasa disponibilidad y los costes elevados que supone (26).

La RMmp permite, a través del sistema de gradación “Prostate Imaging – Reporting and Data System” (PI-RADS v2) identificar y clasificar las lesiones sospechosas, para así dirigir las biopsias y hacerlas más selectivas (27). PI-RADS v2 utiliza una escala de evaluación de 5 puntos que indica la probabilidad de que los hallazgos de RMmp se correlacionen con la presencia de CaP clínicamente significativo en una ubicación anatómica particular. Las categorías de evaluación de PI-RADS v2 se definen con las siguientes puntuaciones (28):

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

El grado de variabilidad en la interpretación de imágenes hace que sea difícil confiar solo en la RMmp, ya que el valor predictivo negativo (VPN) llega a ser incluso del 75% en algunos estudios (29). Un metaanálisis reciente concluyó que el factor predictivo más útil de no encontrar cáncer de próstata significativo en hombres con estudios de RMmp negativos, era una densidad de PSA inferior a 0,15 ng/ml (30).

1.1.4 Imágenes de PET / CT de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA PET / CT)

La tomografía por emisión de positrones (PET) basada en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) correlacionada con la tomografía computarizada (TC) está emergiendo rápidamente para la estadificación del cáncer de próstata intermedio y avanzado (31) y también pueda tener utilidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento, pero este aspecto requiere una mayor investigación (32)

1.1.5 Biopsia prostática

Pese a todos los métodos descritos previamente, el diagnóstico final del CaP recae en el estudio anatomopatológico del tejido obtenido en la biopsia; de este modo se identifica la estirpe tumoral y su clasificación según su arquitectura celular, mediante la clasificación de Gleason. Desde el 2014, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) simplifica esta clasificación, reduciendo el número de grados de CaP a 5 (33), aportando esta simplificación una mejor estimación pronóstica cuando se incluye en un perfil de riesgo como el de D'Amico (34)

Tabla1. Sistema de Gleason modificado de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) 2014 (33)

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

A pesar de todo, la tasa de falsos negativos de la biopsia llega a un 20%-30% de los pacientes (35) lo que conduce a la repetición de biopsias en más del 40% de ellos, o a seguimientos en consulta de forma estrecha ante los parámetros alterados que pueden sugerir la existencia de enfermedad (36).

En cuanto a evitar biopsias innecesarias, existe otra prueba, llamada **ConfirmMDx**, que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación múltiple para medir el estado epigenético de los biomarcadores de genes asociados al cáncer de próstata *GSTPI*, *APC* y *RASSF1* en muestras de tejido de biopsia de próstata negativas

para CaP (37). Se observó que los niveles bajos de metilación en pacientes con biopsia de próstata negativa tiene un VPN de 96% para tumores de alto grado, disminuyendo la indicación de sucesivas biopsias (35).

Se están realizando investigaciones sobre análisis genómicos mejorados y biomarcadores clínicamente útiles; por ejemplo, uno de estos analiza la sobreexpresión de la fosfatasa 3 del hígado en regeneración (PRL-3), que se ha asociado con el cáncer de próstata agresivo de alto grado (38). Actualmente se están investigando biomarcadores experimentales similares por su papel potencial en la toma de decisiones clínicas en el cáncer de próstata.

1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

La primera decisión en el manejo del cáncer de próstata es determinar si se necesita algún tratamiento. El cáncer de próstata, especialmente en los tumores de bajo grado, a menudo crece tan lentamente que no se requiere tratamiento, particularmente en pacientes de edad avanzada y aquellos con comorbilidades que limitarían razonablemente la esperanza de vida a 10 años adicionales o menos.

1.2.1 Vigilancia activa

La vigilancia activa es apropiada para hombres con cáncer de próstata de bajo grado (Gleason 3 + 3 = 6 o menos con un PSA menor de 20) y cánceres de tamaño limitado (39). Para cánceres de grado intermedio, de menor riesgo y seleccionados (Gleason 3 + 4 = 7 con un PSA menor de 10) es controvertido, pero parece razonable en casos seleccionados (40). Aquí es donde las pruebas genómicas pueden ofrecer algunos beneficios reales al estimar y aclarar de manera segura el verdadero riesgo relativo de progresión y agresividad del tumor en estas situaciones límite (41).

1.2.2 Tratamiento en la enfermedad localizada

El tratamiento definitivo de la enfermedad localizada ahora incluye radioterapia (haz externo y/o colocación de semillas radiactivas de braquiterapia), prostatectomía radical, terapia focal y crioterapia. Por lo tanto, para la mayoría de los pacientes con enfermedad

localizada potencialmente curable, buen estado funcional, calidad de vida razonablemente buena y una esperanza de vida superior a los 10 años, la elección del tratamiento debe ser una decisión informada del paciente tomada después de discusiones que incluyan tanto urología como radioterapia (42).

1.2.3 Tratamiento en la enfermedad metastásica

Si el cáncer se ha extendido más allá de la próstata, las opciones de tratamiento cambian significativamente. La terapia hormonal, la radioterapia limitada, los radiofármacos, la inmunoterapia y la quimioterapia son los tratamientos estándar reservados para una enfermedad que se ha extendido más allá de la próstata y ya no se considera curable. Por ejemplo, la radioterapia limitada puede ayudar de manera espectacular a controlar el sangrado prostático o aliviar el dolor de huesos insoportable de un depósito de cáncer metastásico (43).

1.3 VALORACIÓN DEL PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Existen varias clasificaciones y escalas para estratificar el riesgo de recidiva de la enfermedad; así desde 1998 la clasificación de riesgo descrita por D'Amico, en la que según el PSA, Gleason de la biopsia y el estadio Clínico T de la enfermedad, los pacientes tienen bajo, intermedio o alto riesgo de recidiva bioquímica posterior al tratamiento (34). En los últimos años existen nomogramas que también analizan estos parámetros, como Briganti (44), Partin y Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) para predecir la invasión de los ganglios linfáticos y ayudar así a los cirujanos, según el riesgo, a tomar la decisión de hacer cirugías con linfadenectomía de mayor o menor extensión (45).

1.3.1 Otros marcadores tisulares

Además del análisis anatomopatológico, en casos de prostatectomía radical donde junto con el Gleason se tendrá muy en cuenta el estadio T de la enfermedad (afectación capsular, presencia de márgenes), la invasión linfovascular y la afectación ganglionar (en

caso de linfadenectomía), para la valoración del pronóstica de la enfermedad (46) la investigación de marcadores de cáncer de próstata ha ampliado sus horizontes con el descubrimiento de varios biomarcadores alternativos prometedores que muestran una sensibilidad y especificidad mejoradas con respecto al PSA:

✓ **Prueba Oncotype DX**

Es un ensayo de expresión que evalúa la actividad de un conjunto de 12 genes relacionados con el cáncer y que están involucrados en cuatro vías biológicas diferentes, incluida la vía de los andrógenos (*AZGP1*, *KLK2*, *SRD5A2*, *RAMI3C*), la proliferación (*TPX2*), la organización celular (*FLNC*, *GSN*, *TPM2*, *GSTM2*) y la respuesta estromal (*BGN*, *COL1A1* y *SFRP4*). Estas medidas se combinan algorítmicamente para calcular una puntuación de próstata genómica (GPS). Este ensayo ha sido validado analítica y clínicamente como predictor de cáncer de próstata agresivo y permite la estratificación del riesgo de cáncer de próstata para guiar a los médicos en la toma de decisiones de tratamiento (47).

✓ **Prueba ProMark**

ProMark es una prueba de pronóstico basada en proteínas para predecir la agresividad del cáncer de próstata, particularmente en pacientes con puntuaciones de Gleason 3+3 o 3+4. Esta prueba mide la expresión de ocho proteínas (*DERL1*, *CUL2*, *SMAD4*, *PDSS2*, *HSPA9*, *FUS*, *S6 fosforilado*, *YBOX1*) en secciones de tejido de biopsia empleando un método de inmunofluorescencia automatizado. Sobre la base de los niveles de expresión de estas ocho proteínas se calcula una puntuación de riesgo, y puede ayudar a estratificar a los pacientes para la vigilancia activa frente a la intervención terapéutica (48).

✓ **Prueba de Prolaris**

Esta prueba mide la expresión de un conjunto de 31 genes de progresión del ciclo celular y 15 genes de mantenimiento para predecir la progresión de la enfermedad. Una expresión baja de estos genes se asocia con un riesgo bajo de progresión y esos hombres pueden ser candidatos para la vigilancia activa, mientras que una expresión alta se asocia con un riesgo más alto de progresión de la enfermedad en los hombres que pueden ser tratados. Esta prueba es significativamente más pronóstica que las variables clínico-patológicas utilizadas actualmente (49). También estima el riesgo de recurrencia de la enfermedad tras prostatectomía (50).

✓ Deleciones del gen PTEN

PTEN es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 10 que comúnmente se pierde en el cáncer de próstata. Esta pérdida conduce a la activación de la vía de señalización de la fosfoinositido-3-quinasa (PI3K), que juega un papel fundamental en el crecimiento, proliferación y metástasis celular y, además, a la inhibición de la vía de señalización del receptor de andrógenos (RA) (51). Las deleciones de *PTEN* se asocian con un mal pronóstico y una enfermedad hormonorrefractaria, y se utilizan como un biomarcador predictivo de la respuesta al tratamiento (52). Además, estas deleciones combinadas con las fusiones del gen *TMPRSS2-ERG* tienen aún mejor potencial pronóstico (53)

La nueva generación de biomarcadores de cáncer de próstata parece prometedora y puede ayudar a cumplir con los desafíos clínicos no resueltos hasta ahora y guiar a los médicos hacia mejores diagnósticos y mejores opciones de tratamiento para el cáncer de próstata (16).

1.4 IMPORTANCIA DEL ESTROMA EN LA CARCINOGENESIS Y TRANSFORMACIÓN HACIA EL ESTROMA ACTIVADO

El epitelio prostático humano está compuesto de células epiteliales secretoras cuboideas a columnares con complejos de unión apical, una capa continua de células basales y escasas células neuroendocrinas, cada una unida a una lámina basal, organizándose como acinos glandulares que secretan en el espacio luminal que converge en un conducto y en la uretra; al otro lado de la lámina basal se encuentra el **estroma fibromuscular**, compuesto por células de músculo liso que regulan el crecimiento prostático en condiciones normales, fibroblastos que son las células más importantes del estroma y una matriz extracelular rica en fibras de colágeno que interviene entre los acinos secretores; así como otras células clave del estroma incluyen células endoteliales, diversas células inmunitarias y fibras nerviosas autónomas y ganglios asociados (Fig1) (54).

Los fibroblastos, células clave del estroma, intervienen en la angiogénesis, la reparación tisular y en la síntesis y depósito de los componentes de la matriz extracelular, facilitando que otras células puedan asentarse o migrar creando determinadas arquitecturas órgano-específicas (55).

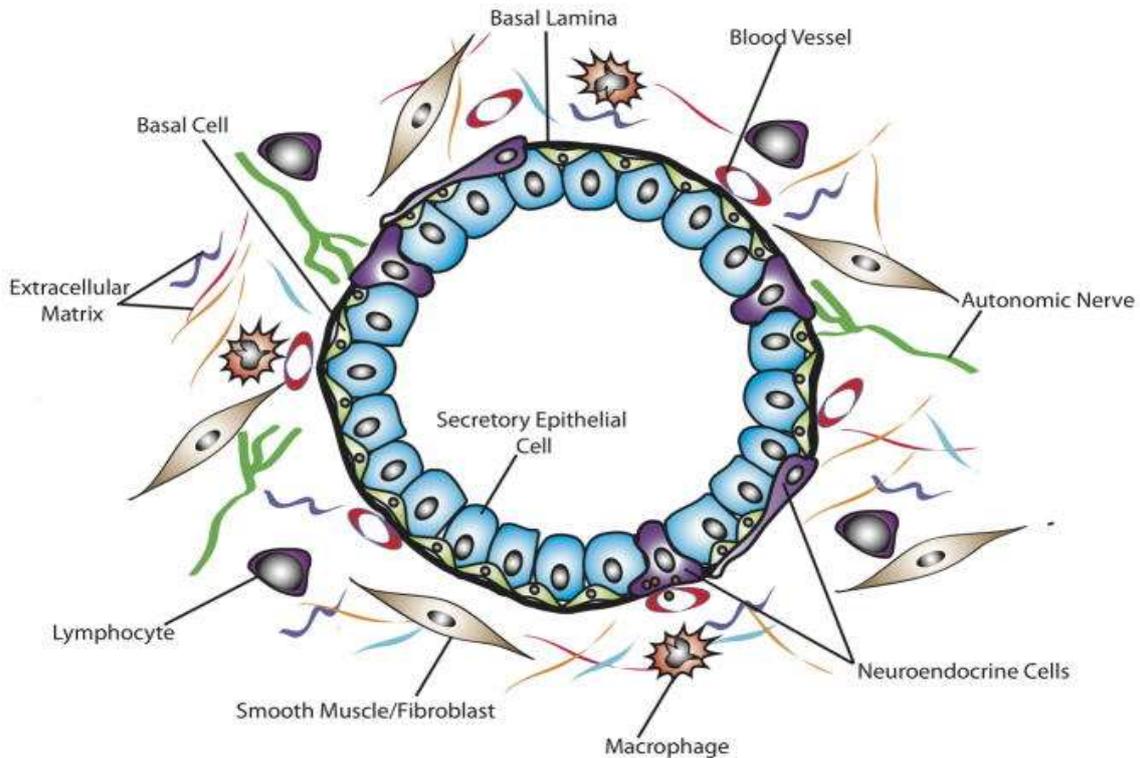


Figura 1. Componentes celulares de la glándula prostática humana (54)

El estroma normal se modifica con una plasticidad propia para responder rápidamente a situaciones como la reparación de heridas y la alteración de la homeostasis que pueden resultar de la génesis del cáncer. Como tal, los componentes del estroma dentro del microambiente inmediatamente adyacente al epitelio actúan de manera coordinada cuando el epitelio sufre daño o se rompe (56). Aunque los mecanismos clave aún no se comprenden, estos cambios podrían atribuirse a la acción de los andrógenos y a procesos inflamatorios que conducen a un efecto trófico constante de la glándula, así como una inflamación crónica. Las agresiones epiteliales repetidas por microorganismos, el proceso de envejecimiento y la acción crítica de los andrógenos para regular la biología de la glándula, dan como resultado un cambio en su biología, que pasa a tener una función de reparación crónica de heridas (57).

Las alteraciones fenotípicas y genotípicas que ocurren durante esta respuesta al daño se han denominado **estroma reactivo**. Este estroma alterado es muy similar al encontrado en la reparación de heridas e incluye remodelación de la matriz y expresión alterada de factores de crecimiento y citocinas asociados a la reparación (58).

En cuanto al papel del RA en la regulación de la homeostasis en las células del estroma de la glándula prostática parece que se expresa en un subconjunto de fibroblastos en la

glándula prostática y regula la expresión de varios factores de crecimiento (59). La acción de los andrógenos estimula la mioidiferenciación de los fibroblastos de próstata y mejora los efectos de la mioidiferenciación inducida por TGF- β (60). Además, se observó en múltiples estudios que los factores secretados por la estimulación androgénica de las células del estroma estimulan la proliferación de células de cáncer de próstata; por el contrario, una desactivación del RA en dichas células produce menor proliferación de células epiteliales, una alteración en el depósito de colágeno y una disminución de la expresión de varios factores de crecimiento. Estos estudios sugieren que la acción de los andrógenos en el estroma de la próstata es importante para el mantenimiento de la homeostasis y puede desempeñar un papel en la biología del estroma reactivo en el cáncer de próstata (61).

El estroma reactivo se asocia con un mayor número de miofibroblastos / fibroblastos asociados al cáncer (CAF), mayor densidad capilar y depósito de colágeno tipo I maduro así como otros sustratos asociados con la matriz extracelular (MEC) (62). Si bien se considera que los fibroblastos normales son fundamentales para mantener la homeostasis tisular, sus forma activadas, miofibroblastos y CAF, promueven la progresión tumoral a través de su biología centrada en la reparación y pro-supervivencia que incluiría nuevo crecimiento y angiogénesis (57). Existen datos que sugieren que el origen del estroma reactivo se produce por la activación de las células del estroma inmediatamente adyacentes a la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (63); en varios estudios con CaP se observó un grupo de miofibroblastos que evolucionaron de un anillo periácinar de fibroblastos adyacentes a un foco de PIN y no del músculo liso de próstata normal, lo cual se tradujo en una elevación de vimentina y síntesis de colágeno I adyacentes a los focos de PIN (64). Las células PIN del precarcinoma, en lugar de invadir el compartimento estromal normal inducen un estroma reactivo que evoluciona con las células del carcinoma y de forma conjunta desplazan el tejido normal para componer los focos cancerosos que finalmente forman el tumor (65).

En varios estudios, Tuxhorn et al. (66) observaron que en el tejido del carcinoma de próstata humano, el estroma reactivo en los focos de cáncer de próstata Gleason 3 estaba compuesto por aproximadamente un 50% de fibroblastos y un 50% de miofibroblastos, mientras que el estroma en los focos de Gleason 4 estaba compuesto principalmente por miofibroblastos. La caracterización inmunohistoquímica de muestras de tejidos normales, PIN y CaP reveló las características principales del estroma reactivo por CaP, ayudando

a comprender las propiedades pro-tumorigénicas de los CAF y la matriz extracelular. En comparación con el estroma de próstata normal, el estroma reactivo tiene un número menor de células de músculo liso (identificadas por la expresión de α -SMA y calponin) y un elevado número de CAF de los que algunos muestran fenotipos similares a los fibroblastos (expresan vimentina y FSP-1) y otros fenotipos más parejos a los miofibroblastos (expresan vimentina y α -SMA) (66).

Los CAF se caracterizan por una alta expresión de genes que incluyen FAP, PDGFRB, TNC, ASPN y POSTN, entre otros, que contrasta con los fibroblastos de próstata normales (67). Además, inducen una alta deposición de colágeno-I y TNC, características típicas del estroma reactivo, y expresan la proteína activadora de fibroblastos (FAP), una proteasa unida a la superficie celular que es capaz de inducir la degradación del colágeno-I, lo que contribuye a la remodelación de la matriz. Por otra parte, la expresión de laminina se reduce en el estroma reactivo, lo que indica la rotura de la membrana basal (68) (fig.2) (69)

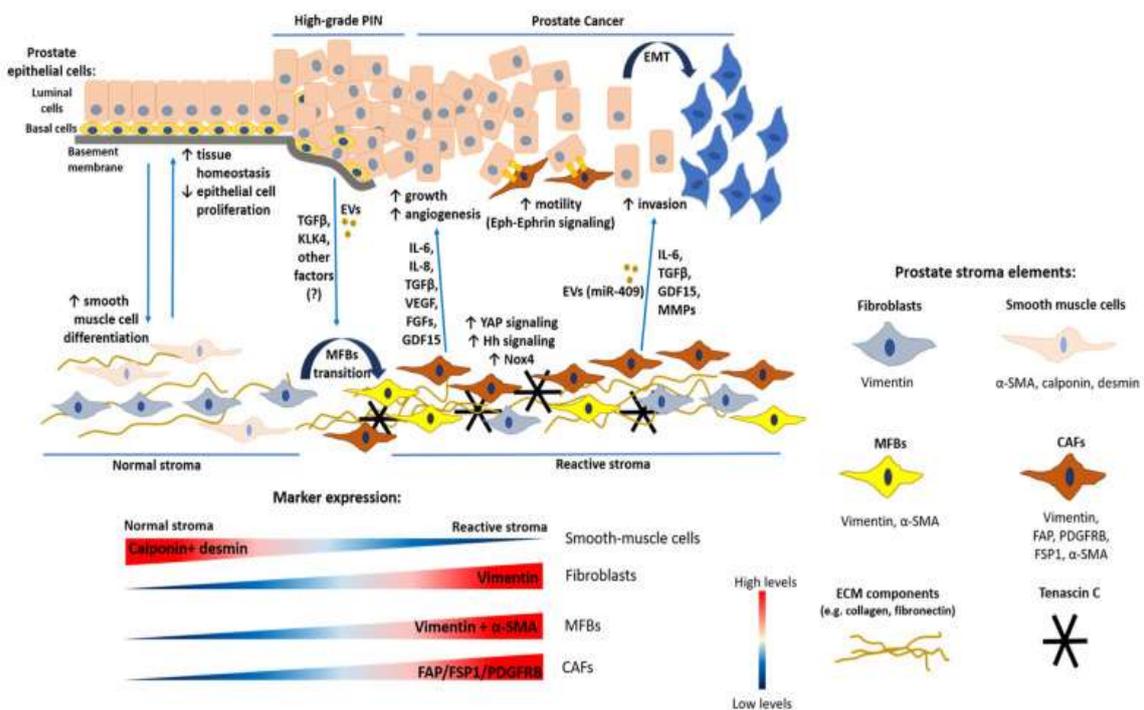


Figura 2. Interacción estroma-epitelio en la progresión del cáncer de próstata (69)

Otros estudios han aportado pruebas de las propiedades proangiogénicas e inmunomoduladoras de los CAF en la carcinogénesis de próstata (70), así como también se sabe que los fibroblastos de diferentes zonas de la próstata tienen una influencia diferente, no sólo en la carcinogénesis del CaP primario, sino también en el desarrollo metastásico; así los fibroblastos de las zonas periféricas y de transición, a diferencia de los fibroblastos de la zona central, alteran el perfil citogenético y estimulan la oncogénesis de las células LNCaP in vivo; De hecho, los fibroblastos periféricos y de la zona de transición fueron capaces de promover el crecimiento tumoral independiente de andrógenos de células LNCaP de adenocarcinoma de próstata sensibles a andrógenos en ratones castrados e incluso la formación de metástasis en ganglios linfáticos, huesos y pulmones (71).

Se han descrito otros eventos reguladores como la secreción de microvesículas a partir de células derivadas de la médula ósea; la naturaleza de estas interacciones puede involucrar la reprogramación epigenética del genoma del estroma local a uno más similar al de un CAF (72), la comunicación directa entre las células derivadas de la médula ósea y el estroma local también puede mediar la conversión recíproca a células con fenotipos más ‘reactivos’, similar a lo que ocurre cuando interacciona el epitelio y el estroma (73).

Con todo esto, cada vez está más claro que el compartimento estromal es importante para el desarrollo y la progresión del tumor; de ello se deduce que el desarrollo de marcadores de pronóstico y dianas terapéuticas en el compartimento estromal es una posibilidad clara para el futuro.

1.5 CULTIVOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE FIBROBLASTOS DEL ESTROMA PROSTÁTICO

Debido a que la mayoría de los tumores de próstata surgen en las células epiteliales glandulares, estas han sido un foco importante de investigación; no obstante, las células cancerosas que crecen en cultivo en suspensión, o como monocapa sobre superficies de plástico, se usan comúnmente como modelos de cáncer en exámenes preclínicos de eficacia de fármacos y sin embargo las principales deficiencias de tales modelos incluyen la falta de heterogeneidad que refleja la malignidad original, así como un microambiente inadecuado, por lo que parece dejar claro que las interacciones entre los componentes de

la matriz estromal, epitelial y extracelular juegan un papel importante en la definición del fenotipo maligno, por lo que requiere de su estudio y conocimiento (74). Para mejorar la relevancia clínica de los modelos de cáncer in vitro, parece imperativo utilizar tejido / células cancerosas clínicamente relevantes que representen mejor la heterogeneidad y complejidad de los cánceres e imitar el microambiente tumoral con mayor precisión (75). La heterogeneidad también se refleja en la diversidad de tipos de células y la composición de la matriz extracelular que comprende la transformación de la matriz extracelular (TME), la cual desempeña un papel esencial en la regulación de la proliferación de células cancerosas, angiogénesis, invasión, metástasis, evasión inmunitaria y resistencia hormonal, y por ello, el estudio del estroma y especialmente de los fibroblastos, y sus formas activadas, es muy atractivo, ya que está presente tanto en procesos benignos inflamatorios como en los procesos tumorales, sufriendo como ya hemos visto importantes cambios con relación al CaP (76). Además, la variabilidad genómica de las células epiteliales es mucho más inestable en comparación con los fibroblastos estromales, por lo que supone una ventaja frente a los cultivos celulares de cáncer de próstata con dichas células epiteliales (77). Los estudios basados en modelos de xenoinjertos de células humanas han demostrado que la recombinación de los CAF con células epiteliales no tumorales da como resultado su transformación maligna permanente (78). Los factores solubles secretados por los CAF actúan de forma paracrina en las células epiteliales adyacentes y trabajan en coordinación con otras moléculas de señalización para facilitar la carcinogénesis y la progresión del cáncer (79). Igualmente, estos cultivos con fibroblastos permitirán comprobar su comportamiento mediante la interacción con células epiteliales prostáticas de diferentes líneas, con sistemas de cocultivo (80). La presencia de tipos de células no cancerosas en el microambiente tumoral puede, en parte, imitarse mediante el cultivo conjunto de células cancerosas con tipos de células de interés. Como el tipo de célula más abundante en el estroma tumoral, y dadas sus capacidades de promoción de tumores, los CAF se utilizan con frecuencia en sistemas de cocultivo. Además, los sistemas de cocultivo de fibroblastos y células cancerosas se han utilizado en combinación con técnicas de cultivo en 3D y han proporcionado modelos in vitro más fiables para imitar las interacciones estroma-epitelial en el tumor. En estos modelos se ha observado la capacidad de los CAF para promover la oncogénesis y apoyar el desarrollo del cáncer y la invasión tisular (81).

Los fibroblastos aislados pueden expandirse in vitro y emplearse para análisis adicionales de, por ejemplo, ADN, ARN, proteína, etc (82). Además, las modernas técnicas de estudio molecular de alto rendimiento permiten identificar procesos relevantes en la carcinogénesis y progresión de la enfermedad, así como profundizar en el conocimiento de múltiples mecanismos que pueden alterar determinados genes clave, destacando las anomalías cromosómicas, mutaciones, translocaciones o metilaciones (83).

Los cultivos celulares con fibroblastos pueden ser congelados para estudios posteriores y en cuanto a una de sus desventajas que sufrimos en nuestro trabajo, es la pérdida de cultivos por contaminación de las muestras.

1.6 MARCADORES DE INTERACCIÓN EPITELIO-ESTROMA

Como ya hemos comentado, la comunicación bidireccional entre las células y su microambiente es crítica tanto para la homeostasis de tejidos normales como para el crecimiento tumoral (84). En particular, las interacciones entre las células tumorales y el estroma asociado representan una relación poderosa que influye en el inicio, la progresión y el pronóstico del paciente. Es una evidencia el grado de interconexión dentro de los cánceres, mediante el cual las células estromales no solo envían señales de ida y vuelta a las células tumorales, sino también entre sí (85).

A continuación, se describen algunos de los factores implicados en la interacción estroma-epitelio en el cáncer de próstata y cuya expresión podría estudiarse como futuros marcadores para el mejor conocimiento de esta enfermedad.

1.6.1 Cadherina 11 (CDH11)

Las cadherinas pertenecen a una familia de glicoproteínas transmembranales dependientes de calcio y son responsables de la adhesión celular, por tanto, fundamentales para el mantenimiento de la arquitectura y funcionalidad de los tejidos, interviniendo en el reconocimiento celular, la morfogénesis del tejido y la supresión de tumores (86).

Las cadherinas se clasifican en cinco subfamilias de acuerdo a la estructura de sus dominios extracelulares y organización genómica, tipo I o clásicas, tipo II o atípicas, desmocolinas, desmogleínas y protocadherinas (87).

Presentan un dominio extracelular (EC) muy variable con el que se unen a otras cadherinas de células adyacentes; algunas de ellas también disponen de una región transmembranal y un dominio intracelular que interactúa con proteínas citoplasmáticas denominadas cateninas (α catenina , β catenina y p120), que regulan la función adhesiva de las cadherinas (88).

Las cadherinas tipo I, clásicas, se caracterizan por su dominio citoplasmático altamente conservado y son hasta el momento las más estudiadas. En este grupo se encuentran la cadherina E, la P y la N. Por el contrario las cadherinas atípicas, de tipo II, siendo la cadherina 11 el prototipo de esta subfamilia, no conservan el mismo dominio citoplasmático debido a una variación de aminoácidos (89).

Aparentemente, la participación activa de las moléculas de adhesión en la capacidad metastática de las células tumorales es crucial y en particular la de las cadherinas, ya que la alteración en su expresión genera pérdida de función del complejo de adhesión, jugando así un papel crítico durante la progresión tumoral (90). Como ejemplo, la pérdida de función de la cadherina E en carcinomas epiteliales conduce a la progresión a un estado invasivo-metastático (91).

La cadherina 11 (CDH11) es también conocida como cadherina osteoblasto (OB-cadherina) ya que se descubrió por primera vez en osteoblastos de ratón (92). Cuenta con dos isoformas, la primera interactúa con β -catenina y otras proteínas intracelulares, tales como p120 y α -catenina, importantes para la señalización y la motilidad; y la segunda isoforma que contiene los mismos dominios extracelulares que la primera, solo que tiene cambios en el dominio transmembranal, por lo que no interactúa con otras cateninas (93). Es una cadherina mesenquimatosa que se expresa principalmente en osteoblastos y sinoviocitos, y en niveles bajos en los pulmones, testículos y tejidos cerebrales (94). Entre sus acciones, promueve un aumento en la migración de células mesenquimales en condiciones normales y en las células de origen epitelial en condiciones patológicas. Se observó una expresión aberrante de cadherina-11 en varios cánceres de origen epitelial, incluidos los cánceres de mama, gástrico y de próstata. Aunque las células epiteliales normales de la próstata expresan E-cadherina, se encontró que la CDH11 se sobreexpresa en células de CaP que han hecho metástasis ganglionares y/o óseas. Se cree que su dominio citoplasmático juega un papel crítico en la migración e invasión de células CaP, pudiendo activar una vía de señalización para promover estas actividades celulares

proporcionando un enlace físico entre las células CaP y los osteoblastos, y también modulando las actividades celulares que mejoran la capacidad de las células CaP para migrar e invadir el entorno óseo (95).

Se ha sugerido por tanto que juega un papel crucial en las interacciones estroma-epitelio, pudiendo estar involucrada en la migración tumoral. Esto concuerda con la interacción de las células estromales y cancerosas en un subtipo de cáncer gástrico que se caracteriza por la sobreexpresión de CDH11 (96).

Además, se sugiere un papel en la invasión y metástasis de las células tumorales para el cáncer de mama; en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama invasivo se observa la expresión de cadherina-11, mientras que no se puede detectar ninguna expresión en ninguna línea celular no invasiva (97).

En las líneas celulares de cáncer de próstata, la expresión de cadherina-11 se encuentra en aquellas líneas que han perdido la expresión funcional de E-cadherina, atribuible a la pérdida de expresión de α -catenina (98).

En condiciones normales se expresa de forma muy débil en el estroma que rodea a los acinos secretores prostáticos no malignos. En todos los cánceres prostáticos existe expresión notablemente aumentada, y de particular interés es el cambio en el origen celular de esta expresión; así, en los tumores de bajo grado, la expresión se limitó a las células del estroma, mientras que, en los tumores de grado intermedio y alto las células de carcinoma también la expresaron. La expresión inducida en las células cancerosas se correlacionó significativamente con el grado de Gleason. Además, en muchas de las lesiones metastásicas de CaP, se encontró sobreexpresión de cadherina-11 (99).

Se expresa a niveles altos en los osteoblastos, existiendo un papel potencial de la misma en la aparición de metástasis óseas. En varios estudios con modelos animales, la sobreexpresión de cadherina-11 aumentaba la colonización de las células del Cáncer de Próstata en el hueso (100).

Parece ser que la expresión de CDH11 en las células de CaP permite que las células se propaguen, migren e invadan, lo que resulta en una mayor intercalación de las células CaP en una capa de osteoblastos, por lo que se sugiere que la expresión atípica en condiciones patológicas activa nuevas vías de señal para mejorar la metástasis de las células CaP al hueso (101).

Debido a que la migración e invasión celular mediada por CDH11 dependen de su dominio citoplasmático, estas actividades celulares probablemente estén mediadas por la activación de las vías de señal intracelular. La mayoría de los estudios sobre la señalización de cadherina se han centrado en la E-cadherina. Aunque tanto la E-cadherina como la cadherina-11 se unen a p120 y β -catenina, tienen diferencias fundamentales en sus funciones. E-cadherina suprime la invasividad de las células tumorales; sin embargo, CDH11 está asociada con un fenotipo invasivo (101). Probablemente interactúa con un conjunto único de proteínas para modular las actividades celulares que promueven el fenotipo invasivo de las células CaP. Existen estudios sobre varios genes conocidos por estar involucrados en la motilidad e invasividad celular mediante la regulación por CDH11 (99).

Recientemente, se ha identificado que el agotamiento de andrógenos es uno de los mecanismos que conduce a su regulación positiva en el CaP. Se observó en varios estudios la sobreexpresión en la mayoría de los tumores resistentes a la castración, mientras que solo la expresaron el 14% de los tumores de próstata hormono sensibles. Se desconoce el mecanismo por el cual RA suprime la expresión de CDH11 (102).

Existen análisis de cultivos celulares que muestran que su regulación por la actividad del RA está mediada a nivel de la transcripción. Se compararon los perfiles de expresión génica de las biopsias de tumores de próstata primarios independientes de andrógenos con los de tumores primarios dependientes de andrógenos, y se encontró que CDH11 está regulada por aumento en tumores independientes de andrógenos. Por lo tanto, esto sugiere que la reducción o pérdida de la actividad RA debido a la intervención clínica o la progresión del cáncer puede aumentar su expresión. Por lo tanto este aumento podría ser uno de los mecanismos que vinculan la propensión de los CaP resistentes a la castración a hacer metástasis óseas (103).

1.6.2 C-X-C Ligando de la quimiocina 14 (CXCL14)

Las quimiocinas forman una familia de proteínas secretadas que estimulan la quimiotaxis y el crecimiento celular; son proteínas pequeñas de aproximadamente 8–14 kDa que actúan tanto de forma autocrina como paracrina y ejercen efectos locales y sistémicos (104). Existen más de 50 quimiocinas y se dividen en los grupos CXC, CC, C y CX3C. Las quimiocinas activan los receptores de la superficie celular que pertenecen a la familia

de receptores acoplados a proteínas G (105). Se han identificado en torno a 20 receptores de quimiocinas. Algunos receptores se unen a varios ligandos; en cambio otros son altamente específicos como CXCR4 y CXCR6, que se unen solo a CXCL12 y CXCL16, respectivamente. Para algunas de las quimiocinas, como C-X-C Ligando de quimiocina 14 (CXCL14), el receptor aún no se ha identificado (106).

Las quimiocinas son responsables de múltiples acciones, dependiendo del tipo y lugar de acción, entre las que se han demostrado las siguientes:

- contribuyen a la infiltración de leucocitos en tumores (107)
- efectos proangiogénicos directos (108)
- proliferación y migración de células tumorales (109)
- contribuyen al crecimiento tumoral mediante el reclutamiento de células endoteliales derivadas de la médula ósea (110)
- confieren efectos prometastáticos en algunos tipos de células cancerosas (111)
- estimulación de fibroblastos (112)

Existen múltiples tipos de células en el microambiente tumoral, productoras de quimiocinas, entre las que destacan como un importante productor los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (113). La quimiocina CXCL14, anteriormente designada BRAK, MIP-2 γ , BMAC o KS1, tiene quimiotaxis hacia células dendríticas inmaduras(114), monocitos, macrófagos(115) y células NK(116). Se sabe que las células dendríticas (CD) desempeñan un papel clave en el inicio de las respuestas inmunitarias antitumorales (117) y la infiltración de tumores por CD es de gran importancia para la inmunidad antitumoral (118)

La presencia de CD, macrófagos y linfocitos en tumores sólidos se regula a través de la producción local de quimiocinas por las células tumorales y estromales. Las CD no migran a los tumores que no expresan CXCL14, lo que sugiere que CXCL14 puede tener un papel especial en la interacción huésped-tumor y el reconocimiento del tumor por las células inmunes (119).

La molécula del receptor CXCL14 aún no se ha identificado, por lo tanto, los eventos de señalización intracelular provocados por su estimulación no se comprenden completamente en ninguna especie (115). Diversos estudios demuestran un aumento de

expresión de CXCL14 en células cancerosas y/o células del estroma, dependiendo del tipo de tumores, pudiendo en algunos casos aumentar en ambas (120–122).

CXCL14 se expresa fuertemente en células inflamatorias y estromales adyacentes a tumores de próstata (123) y es un potente inhibidor de la angiogénesis, factor de crecimiento básico de fibroblastos o factor de crecimiento endotelial vascular (114).

Por lo tanto, además de la atenuación de la capacidad proliferativa de las células tumorales y el reclutamiento mejorado de las células inmunes circundantes, es posible que también inhiba la neovascularización dentro de los tumores sólidos al bloquear la quimiotaxis de las células endoteliales (124).

Si bien varios estudios han sugerido un papel supresor tumoral, estos hallazgos son contradictorios; por ejemplo en cánceres de próstata y pancreáticos los niveles de expresión son más altos que los de los tejidos normales (120)(122). Además, el expresado endógenamente promovió el crecimiento y la invasividad de las células de cáncer de mama y de páncreas, al adquirir éstas características invasivas, a través de la regulación positiva mediada por ROS de CXCL14 (125). Además, la expresión de CXCL14 es muy alta en los fibroblastos asociados al cáncer de próstata, viéndose que cuando los CAF sobreexpresan CXCL14 se produce un aumento de crecimiento y la migración celular del cáncer de próstata mediante la secreción de citocinas secundarias y quimioatrayentes como el FGF-2 (123). Por lo tanto, en ciertos cánceres malignos, CXCL14 en el microambiente tumoral mejora la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales (Fig.3) (126).

Sin embargo, en varios estudios se observó que la expresión de CXCL14 es mínima incluso nula en algunas líneas celulares de cáncer de próstata debido a mecanismos epigenéticos (hipermetilación del gen promotor), observándose la reversibilidad del mecanismo de silenciamiento génico y, por lo tanto, la restauración de la expresión en las células tumorales puede servir como un poderoso enfoque terapéutico alternativo para tratar diferentes tipos de cáncer (127).

Aún son discutidos los efectos contradictorios, o al menos variables dependiendo del contexto de CXCL14 sobre la formación de tumores, no habiéndose aclarado los mecanismos moleculares específicos así como el efecto de los niveles en la supresión de tumores, como tampoco se conoce la regulación de la expresión del gen, siendo un posible objetivo molecular para la prevención y el cáncer (128).

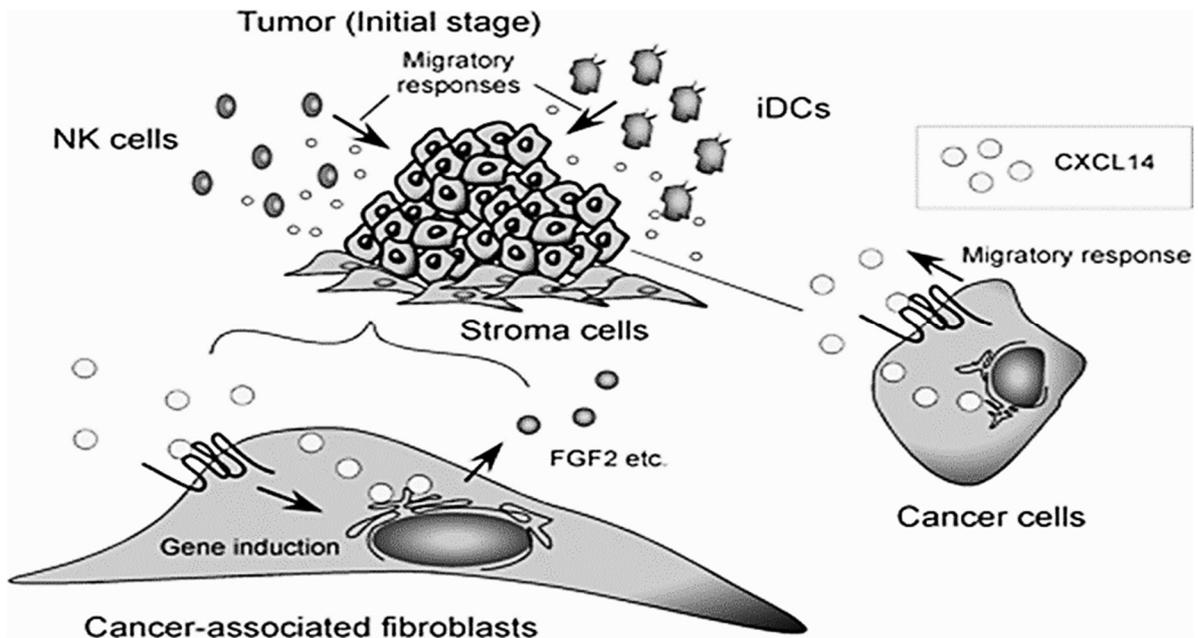


Figura 3. Roles propuestos a CXCL14 durante la carcinogénesis (126)

1.6.3 Factor 1 derivado de células estromales (CXCL12/SDF1)

El factor 1 derivado del estroma (SDF1), también denominado CXCL12, se une e inicia la señalización a través de sus receptores, el receptor de quimiocinas CXC tipo 4 (CXCR4) y el receptor de quimiocinas CXC tipo 7 (CXCR7) (129). Se ha demostrado que desempeña un papel importante y pleiotrópico en la progresión de los tumores malignos, incluido el cáncer de próstata, particularmente en la propagación metastásica de la enfermedad. Los altos niveles del receptor de quimiocinas CXCR4 inducen un fenotipo más agresivo en las células de cáncer de próstata (130).

Al parecer las células de CaP localizadas en las lesiones metastásicas óseas expresan niveles más altos de SDF1 / CXCR4 en relación con las células presentes en los tumores primarios, por lo que se sugiere que la activación de la vía SDF1/ CXCR4 puede desempeñar un papel fundamental en las metástasis óseas del cáncer de próstata. (131).

La señalización SDF1/CXCR4 asociada a otras moléculas puede promover el crecimiento del tumor de próstata (132). Además, el silenciamiento de CXCR4 puede conducir a una reducción significativa en la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), a un retraso en el crecimiento del tumor primario y a la disminución de la incidencia de metástasis óseas (133) .

SDF1 también es producido por las células del estroma de la médula ósea de origen mesenquimatoso, incluidos los osteoblastos, y por las células endoteliales vasculares (134). En varios estudios se demuestra que regula transitoriamente el número y la afinidad de algunos receptores en las células de CaP que adquieren un comportamiento metastásico aumentando la adhesividad y la invasividad en la médula ósea (135).

El cáncer de próstata metastásico recluta células madre mesenquimales, que se convierten en fibroblastos asociados con el cáncer y facilitan la metástasis. En los tumores de próstata, CXCL16, estimula la diferenciación de células madre mesenquimales en fibroblastos asociados al cáncer, que secretan niveles más altos de SDF1; ésta se une a CXCR4 en las células de cáncer de próstata e induce una transición epitelial a mesenquimal (TEM) (136). La inhibición del eje SDF1/CXCR4 conduce a la supresión del aumento de la población de células madre del cáncer de próstata inducido por células madre mesenquimales de la médula ósea y a la regulación a la baja de la expresión de varios marcadores entre ellos el CXCR14 (137). Los factores inducibles por hipoxia inducen la expresión de otras moléculas entre ellas CXCR4 todas ellas implicadas en la TEM, pudiendo producir cambios fenotípicos persistentes incluso al desaparecer las condiciones hipóxicas (138); por lo que parece, la activación de esta vía puede desempeñar un papel fundamental a través de múltiples mecanismos: promoviendo el crecimiento del tumor de próstata, el desplazamiento de las células del cáncer de próstata al hueso y facilitando las interacciones entre las células cancerosas y el entorno óseo (138)(139).

La activación del eje en células de CaP podría deberse a fenómenos oncogénicos o por factores microambientales. Cuando se inhibe CXCR4 podría conducir a la inhibición de la expresión de VEGF y MMP-9, un retraso en el crecimiento del tumor y una reducción de la metástasis. SDF1 puede inducir la expresión de CD164 en células de cáncer de próstata y, por tanto, aumentar su capacidad para adherirse a las células endoteliales de la médula ósea humana (139). En las metástasis óseas, CXCL16 (un ligando para CXCR6) puede estimular la diferenciación de células madre estromales en fibroblastos asociados al cáncer (CAF), que secretan altos niveles de SDF1, pudiendo también estar aumentada la producción local por osteoblastos. La sobreexpresión de SDF1 α y CXCR4 también podría ser estimulada por TGF- β 2, que se expresa por células de cáncer de próstata diseminadas latentes en la médula ósea. Finalmente, el factor inducido por hipoxia (HIF) puede inducir la expresión de moléculas asociadas a la MET (140). (Fig.4) (141).

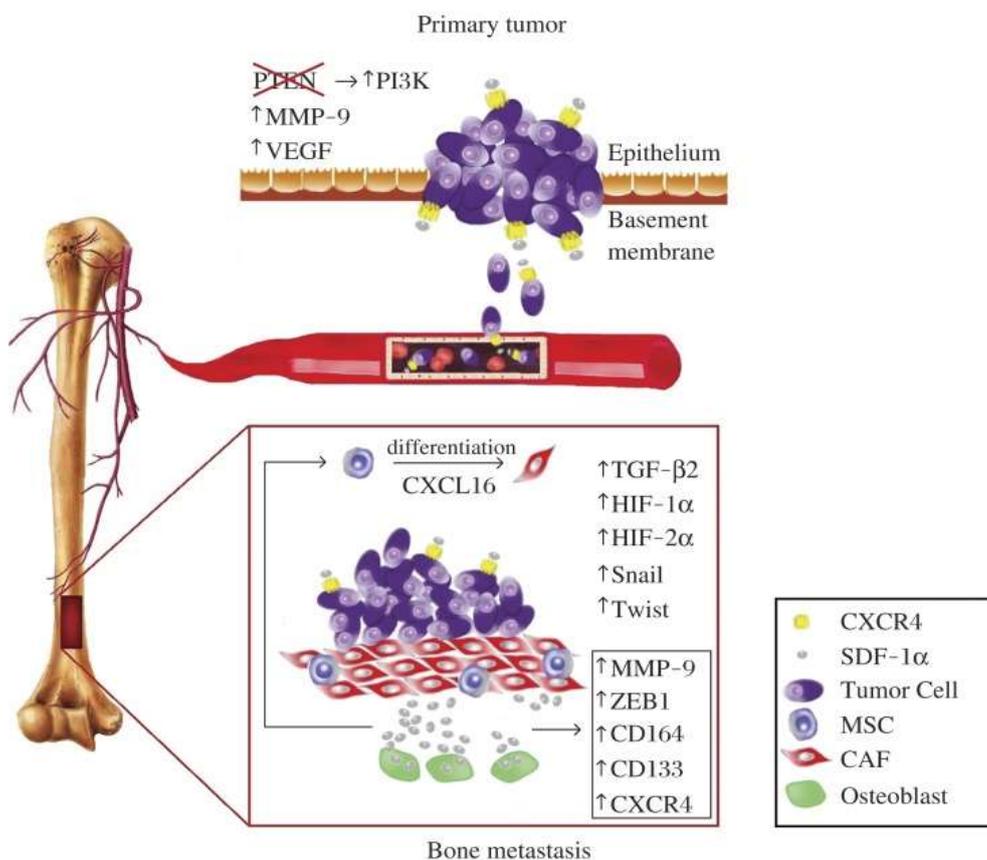


Figura 4. Papel pleiotrópico del eje SDF1/CXCR4 en la metástasis ósea del CaP (141)

En esta línea ya existe un inhibidor SDF1/CXCR4, es el CXCR4 antagonista AMD3100, un fármaco aprobado por la FDA conocido como plerixafor o Mozobil[®] y se utiliza para la movilización de células madre hematopoyética inhibiendo el crecimiento de tumores primarios y reduciendo la incidencia de metástasis en múltiples modelos animales. Sin embargo, la seguridad del tratamiento crónico aún no se ha confirmado en los pacientes (142). Una alternativa sería inhibir la expresión de SDF1 / CXCR4 en cánceres de próstata primarios y metastásicos, sin inhibir directamente la señalización de CXCR4. Para ello, es fundamental identificar el mecanismo por el cual se activa la expresión de CXCR4 en las metástasis óseas del cáncer de próstata, en particular por la hipoxia inducida por el crecimiento tumoral o por intervenciones terapéuticas (143).

En varios trabajos de laboratorio se ha observado que varias quimiocinas de tipo CXC, incluidas CXCL12, promueven la proliferación de células epiteliales prostáticas no transformadas y transformadas, así como células sensibles e insensibles a andrógenos (144).

Las interacciones CXCL12/CXCR4 también puedan mediar en la proliferación de células de cáncer de próstata a través de mecanismos dependientes de RA:

- activa funcionalmente el RA en ausencia de andrógenos (145)
- promueve la acumulación nuclear del corregulador RA y SRC-1 (146)
- estimula la transcripción de genes regulados por RA y la proliferación celular (144)
- activa RA y SRC-1 a través de la fosforilación mediada por PI3K y MAPK (147)

Por tanto, se ha identificado el eje CXCL12 /CXCR4 activado como un nuevo mecanismo dependiente de RA que promueve el crecimiento celular prostático andrógeno dependiente transactivando funcionalmente el RA en ausencia de andrógenos. En base a estos hallazgos se pueden desarrollar nuevas terapias que detengan eficazmente la progresión y la consiguiente mortalidad de los tumores de próstata resistentes a la castración (148).

1.6.4 Proteína activadora de fibroblastos (FAP)

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) es un antígeno de superficie que tiene tanto actividad dipeptidil peptidasa como actividad colagenolítica capaz de degradar la gelatina y el colágeno de tipo I; por secuencia, FAP pertenece a la familia de las serina-proteasas más que a la familia de las metaloproteasas de la matriz (149). La FAP se identificó como un antígeno inducible expresado en el estroma reactivo y recibió el nombre de “proteína de activación de fibroblastos”; un segundo grupo la identificó como una gelatinasa expresada por líneas celulares de melanoma agresivas y se le dio el nombre de “seprasa” para la proteasa expresada en la superficie. La clonación posterior de FAP y seprasa reveló que son la misma serina proteasa de la superficie celular (150).

Un rasgo de los fibroblastos del estroma tumoral es la inducción de la proteína de activación de fibroblastos de serina proteasa unida a membrana- α (FAP), que se sobreexpresa en la superficie de fibroblastos estromales reactivos presentes en el estroma de la mayoría de los tumores epiteliales humanos, no ocurriendo ni en las células epiteliales tumorales ni en fibroblastos u otros tipos de células de los tejidos normales (151). Las FAP son componentes del microambiente tumoral cuyas contribuciones a la progresión maligna no se comprenden completamente, parece que desencadena la inducción de un subconjunto de CAF con un fenotipo inflamatorio dirigido por la activación de STAT3 y por la regulación positiva de CCL12 (152).

Es posible que también pueda estar involucrado en otras vías de escisión esenciales para la función celular, tales como proteínas adhesivas de membrana (cadherinas o integrinas) necesarias para la unión célula-célula, o anclaje celular a MEC cuando las células migran y se dividen; otra de sus posibles acciones sería activar proteínas pro-paracrinas que gobiernan la migración celular dentro de la matriz(151)(153).

Se cree que la FAP digiere las proteínas de MEC a medida que los fibroblastos activados se multiplican, migran, sintetizan y depositan simultáneamente colágeno, fibronectina y otros componentes. Estos procesos parecen ocurrir en sincronía con la angiogénesis, de modo que la MEC adyacente a una neoplasia se remodela a medida que se expanden las células malignas (154).

Para el crecimiento de tumores epiteliales se necesita de la formación de un estroma tumoral de soporte para suministrar nutrientes y factores de crecimiento para la supervivencia de las células tumorales y el crecimiento constante (155). Este crecimiento invasivo va ligado a cambios característicos en el estroma peritumoral como son la neoformación de vasos sanguíneos tumorales, el reclutamiento de miofibroblastos, linfocitos y macrófagos estromales reactivos, la liberación de moléculas de señalización de péptidos y proteasas, y la producción de una matriz extracelular alterada (156). El compartimento del estroma tumoral representa un componente importante de la mayoría de los carcinomas, llegando a suponer el 20-50% de la masa total, llegando incluso al 90% en carcinomas que tienen reacciones desmoplásicas (157) (fig.5)(158).

A diferencia de las células epiteliales malignas, los fibroblastos del estroma tumoral activados no se transforman genéticamente y no demuestran la heterogeneidad genética y fenotípica observada en las células malignas. Los fibroblastos del estroma tumoral reactivos difieren de los fibroblastos de los tejidos adultos normales en lo que respecta a la morfología, los perfiles de expresión génica y la producción de mediadores biológicos importantes como los factores de crecimiento y las proteasas (159).

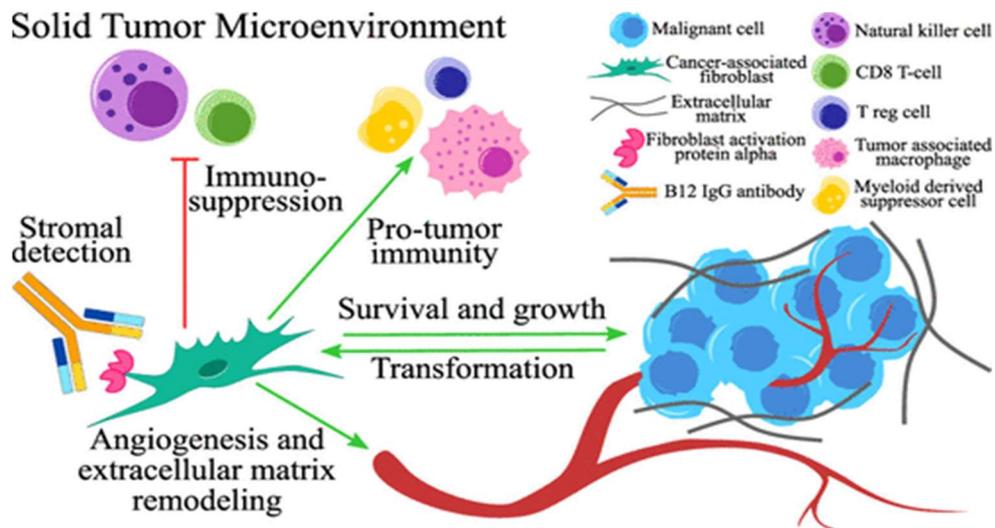


Figura 5. Interacción de FAP en el microambiente tumoral (158)

En estudios recientes Hallie M. Hintz y col. (153) documentaron un aumento significativo en la expresión de ARNm FAP en la enfermedad metastásica en comparación con la enfermedad primaria localizada; se hicieron comparaciones para clasificar y estratificar el aumento en función del tipo de enfermedad, encontrándose que la expresión fue similar en los tumores prostáticos independientemente del grado de Gleason, y tampoco se hallaron diferencias en los tumores metastáticos tratados con antiandrógenos de segunda generación (enzalutamida o acetato de abiraterona) o quimioterapia (taxanos), al igual que los niveles fueron similares independientemente de las localizaciones de las metástasis (ganglio linfático, hueso, hígado, otros). Por otro lado, se estudió la expresión de FAP en el contexto del estado del receptor de andrógenos (RA) y la diferenciación neuroendocrina (NE) siendo similar en todos los subtipos metastáticos, independientemente del estado de RA o de la diferenciación NE. Otras líneas de investigación buscan su utilidad como marcador radiológico para localización de depósito en lugares de posibles metástasis y su diagnóstico en PET-TC (153).

Se trabaja en el FAP como objetivo para la activación de profármacos, como estrategia viable en el tratamiento de diferentes tumores; así tenemos, la Tapsigargina (TG) que es un agente citotóxico muy potente con un mecanismo de acción único independiente de la proliferación; sin embargo, con una falta de especificidad al dirigirse a un proceso celular esencial (160), se ha demostrado un aumento de 100 veces en la ventana terapéutica de un análogo de TG (ERGETGP-S12ADT) cuando se administra en forma de profármaco activado por FAP en modelos de xenoinjerto de CaP (161) .

Estos profármacos activados por FAP tienen una eliminación del tejido tumoral significativamente más lenta que del resto de tejidos no diana (12h frente a 4,5h). El fármaco activo se detecta en tejidos no diana; sin embargo, la evaluación histopatológica no revela evidencia de toxicidad inducida por el fármaco. El efecto antitumoral es comparable al observado con Docetaxel, con toxicidad significativamente menor.

Se continúan estudios para un mayor refinamiento del sitio de escisión de FAP, en busca de una mayor especificidad que pueda reducir la activación del profármaco en tejidos no diana y mejorar el beneficio clínico (162).

1.7 MARCADORES DE INFLAMACIÓN DE LOCALIZACIÓN

PREFERENTEMENTE ESTROMAL

El vínculo entre la inflamación crónica y oncogénesis fue propuesto por primera vez por Rudolf Virchow en 1863, tras la observación de que los leucocitos infiltrantes eran una característica de los tumores (163). Desde entonces, una gran cantidad de estudios han contribuido a la caracterización del estroma prostático y han complicado aún más la ya desafiante tarea de comprender y tratar el cáncer. Mientras que anteriormente el cáncer se consideraba una enfermedad heterogénea que implicaba mutaciones aberrantes en las células tumorales, ahora es evidente que los tumores también son diversos por la naturaleza del microambiente y las proporciones de las células estromales o los estados de activación que los rodean (164). La falta de marcadores específicos de inflamación prostática ha llevado a muchos investigadores a preguntarse si existe un perfil de expresión diferencial de citocinas proinflamatorias en el tejido del CaP (165) y si tal expresión está relacionada con otros parámetros diagnósticos de esta neoplasia (166)

A continuación, desarrollamos las características de algunos marcadores de inflamación, de localización preferentemente estromal y sus posibles implicaciones en el CaP.

1.7.1 Interleucina 6 (IL-6)

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que ejecutan múltiples funciones con capacidad inmunitaria para responder al cáncer, así como funciones relacionadas con el crecimiento celular, inmunidad, diferenciación tisular e inflamación. Son producidas en gran cantidad de respuestas inmunes. Su función es modular el crecimiento, la diferenciación y la activación celular durante una respuesta inmune, de forma que el resultado de una respuesta inflamatoria va a depender del balance de citocinas producidas por las células implicadas en esa respuesta teniendo las interleucinas funciones proinflamatorias o antiinflamatorias (167).

La IL-6 es una citocina pequeña de 186 aminoácidos y bajo peso molecular de 21 kDa codificada por un gen localizado en el hombre en el cromosoma 7p21-14 que se conoce desde 1986 (168).

Es una citocina proinflamatoria considerándose una citocina de la respuesta inmune innata ya que es producida abundantemente por las células de este sistema, pero tiene un papel clave en la diferenciación de células T y B lo que es en la respuesta inmune adaptativa, teniendo un papel importante en la maduración de las células B constituyendo una citocina que promueve la respuesta inflamatoria aguda (169).

Se ha detectado en muchos tipos de células siendo las principales los monocitos y los macrófagos en la inflamación aguda, y las células T en la inflamación crónica. Es una potente citocina inflamatoria liberada no solo por las células inflamatorias, sino también por las células epiteliales del CaP y las células del estroma de la próstata(170).

El receptor de IL-6 consta de dos subunidades: la subunidad IL-6R α (IL-6R) y la subunidad gp130. La unión de IL-6 al receptor de IL-6 activará tres vías principales de señalización: el transductor de señal de la familia de tirosina quinasa Janus (JAK) y la vía del activador de la transcripción (STAT), la vía extracelular regulada por la señal quinasa 1 y 2 (ERK1 / 2) – proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y la vía fosfoinositida 3 – quinasa (PI3-K)(171).

Así la IL-6 es secretada por el monocito (y otras células) actuando sobre otras células localmente o de forma sistémica. En situación homeostática los niveles de IL-6 son bajos, mientras en condiciones de infecciones, estrés, enfermedades inflamatorias...los niveles se elevan. En la vía clásica de señalización la citoquina se acopla a su receptor IL-6R α en la superficie celular, este receptor está presente en hepatocitos y ciertos leucocitos. El gp130 es reclutado por el complejo IL6-IL-6R α seguido por la activación de JAK1, activando STAT3 mediante fosforilación. Con ello se consigue promover la proliferación celular tanto localmente como de forma sistémica e inhibe la apoptosis *in vitro* e *in vivo*. Existe una vía alternativa llamada IL-6 trans-señalización con el receptor soluble de la IL-6 (s IL-6R α) que con su unión a la IL-6 señala cualquier célula que tenga gp130 en su superficie, siendo la responsable de la mayoría de los efectos patológicos en la inflamación crónica. Toda esta cascada de activaciones dan lugar a la transcripción de genes diana responsables de la proliferación celular, la supervivencia y el metabolismo (172).

Con ello, las alteraciones en la señalización de la IL-6 juegan un papel clave en la iniciación y progresión del CaP, metástasis y la resistencia a la quimioterapia (173).

Se describe que está involucrada en la biología del CaP, estando los niveles séricos elevados en pacientes con CaP metastásico o CPRC no tratado en comparación con pacientes sanos o pacientes con enfermedad localizada (174).

Okamoto y col. (175) mostraron por primera vez que las líneas celulares de CaP insensibles a las hormonas DU145 y PC3, pero no las células LNCaP sensibles a las hormonas, todas secretan IL-6 señalando como la IL-6 puede actuar como un factor de crecimiento paracrino y autocrino para las líneas celulares del CaP. Otros autores confirman que solo las líneas celulares refractarias a hormonas expresan IL-6 (176). Además, tanto las líneas celulares dependientes de hormonas como las resistentes a hormonas expresaron las subunidades del receptor de IL-6. Sin embargo, en contraste con Okamoto et al (175) la IL-6 exógena inhibió el crecimiento en líneas celulares dependientes de andrógenos, mientras que no tuvo efecto en las líneas celulares refractarias a las hormonas. Además, el anticuerpo anti-IL-6 inhibió el crecimiento en líneas celulares refractarias a las hormonas. Por lo tanto, los autores plantearon la hipótesis de que la IL-6 experimenta una transición funcional del inhibidor del crecimiento paracrino al estimulador del crecimiento autocrino durante la progresión del cáncer de próstata (176). Las discrepancias entre resultados *in vitro* de diferentes grupos de investigación pueden deberse a las variaciones en las concentraciones de IL-6 y las condiciones de crecimiento de laboratorio. En modelos de xenoinjerto tumoral, se informó un mayor crecimiento *in vivo* de una sublínea de células LNCaP estimuladas continuamente por IL-6 y mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 demostraron la ventaja de crecimiento de las células PC3 productoras de IL-6 (177)

Las células LNCaP tratadas con IL-6 secretaron niveles más altos de VEGF cuya sobreexpresión se ha demostrado en muestras de CaP en relación con el tejido normal. Así la IL-6 puede estar involucrada en la angiogénesis del cáncer de próstata, un proceso fundamental que confiere capacidad de crecimiento y potencial invasivo al tumor (174).

Se trata de un mediador clave en la adquisición del potencial metastásico en el cáncer de próstata. Shariat y col. mostraron que las células LNCaP expuestas continuamente a IL-6 desarrollan una mayor invasividad en las células del CaP, y desarrollando las células del CaP características neuroendocrinas cuando se exponen a IL-6 (178). La IL-6 tiene la capacidad de mediar en la diferenciación de osteoblastos. Los estudios experimentales mostraron que el medio de cultivo de la línea celular PC3, un modelo para el cáncer agresivo aumenta la expresión de IL-6 en células similares a los osteoblastos y mejora la

osteoclastogénesis, un evento clave en el establecimiento exitoso de metástasis óseas osteoblásticas. A su vez, la IL-6 producida por osteoblastos estimula la proliferación celular del CaP. Por lo tanto, puede existir un círculo vicioso en el que la IL-6 liberada por las células de CaP en el microambiente tumoral estimula la actividad de los osteoblastos que a su vez estimula el crecimiento tumoral de forma paracrina(174). De acuerdo con estos hallazgos, los estudios de inmunohistoquímica en cadáveres humanos revelaron una mayor expresión de IL-6 en metástasis óseas y, en menor medida, en metástasis de tejidos blandos (179).

En resumen, los niveles elevados de IL-6 en la patogénesis del cáncer de próstata pueden promover metástasis al actuar sobre el tumor y sobre el microambiente óseo.

La activación del receptor de IL-6 puede representar una vía principal para la activación accesoria del RA demostrándose una regulación positiva de la expresión del RA nuclear por IL-6. Esta citocina aumenta la actividad del RA mediante la activación independiente del ligando de RA aumentando la expresión del gen de RA. La IL-6 tiene un papel importante en la transición del CaP dependiente de la hormona a la hormona independiente se confirma al ver como la IL-6 es capaz de promover el crecimiento de células de cáncer de próstata dependiente de la hormona en condiciones de bajos niveles de andrógenos.*in vitro*. IL-6 puede regular la expresión de genes sensibles a los andrógenos en condiciones de bajos niveles de andrógenos y, por lo tanto, contribuir a la aparición de CRPC (180).

Se ha propuesto que la IL-6 confiere resistencia celular a los agentes citotóxicos en las líneas de cáncer de próstata independientes de hormonas viendo como los niveles de IL-6 en suero previos a la quimioterapia en pacientes con CRPC predicen el PSA y la respuesta clínica al agente quimioterápico (181).

En un intentado de evaluar si la expresión de IL-6 en muestras de CaP es un factor pronóstico de supervivencia, se encontró que esta citocina se asocia positivamente con los tumores que presentan un mayor grado Gleason, pero no ocurría así con los niveles de PSA. Gleason bajo se relacionó con un mayor tiempo de supervivencia libre de recurrencia bioquímica (182).

Con todo esto se ha visto como la IL-6 es un mediador clave en varios pasos de la patogénesis del CaP. Incluyendo desde el inicio de la tumorigénesis de próstata, la estimulación del crecimiento tumoral, la inducción del fenotipo agresivo de cáncer de

próstata, la progresión del cáncer de próstata al estado resistente a la castración, la promoción de metástasis tumoral y la resistencia a la quimioterapia. Decir que con un mayor desarrollo de marcadores inflamatorios en el CaP podría ayudar a identificar a los mejores candidatos para las terapias dirigidas a IL-6 utilizando anticuerpos anti-IL6 (174)(182).

1.7.2 Receptor de la interleucina 17 (IL-17R)

La IL -17 (también llamada IL-17A) se descubrió en 1993 y es el miembro prototipo de la subclase más nueva de citocinas constituyendo una citocina proinflamatoria clave. Es una glicoproteína de 155 aminoácidos con un peso molecular de 35kDa. La familia de la IL-17 está compuesta por seis miembros (IL-17A o IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17F) siendo la IL-17F la que presenta homología más alta con la IL-17A, estando los genes que codifican estas citocinas en el cromosoma 6p12 en el humano. La IL-17A participa en el desarrollo de la autoinmunidad, inflamación e inmunidad tumoral, además de participar en la defensa del huésped contra infecciones bacterianas y fúngicas; en cambio, la IL-17F participa principalmente en la inmunidad a mucosas. La IL-17E es un amplificador de la respuesta de tipo Th2 y la función de los miembros restantes es aún desconocida (183).

La IL-17 es secretada por las células T *helper* 17 (Th 17) y otras células inmunes. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la IL-6 desencadenan la producción de IL-17A por células T CD4+; a éste se le denominó un tercer subgrupo de células T cooperadoras que constituyen las células Th17 conformando un tercer linaje junto con las células Th1 y Th2. Además de las células Th17, existen otras fuentes de IL-17, tales como las células T $\gamma\delta$, las células *T natural killer* (NK), y las células T CD8+, y células de inmunidad innata como los neutrófilos o monocitos que tienen la capacidad de producir IL-17 en condiciones patológicas (184).

Se trata de una citocina inflamatoria capaz de estimular diferentes tipos celulares como las células epiteliales, las células endoteliales o las células fibroblásticas para secretar moléculas proinflamatorias. La IL-7 induce la expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), de la IL-6 y de otras quimiocinas, las cuales incrementan la granulopoyesis reclutando neutrófilos hacia el sitio de infección (185).

Los receptores para la IL-17 (IL-17R) también constituyen una familia diferente de receptores de citocinas. La familia incluye a: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE, los cuales son proteínas transmembrana de tipo I. El IL-17RA fue el primer receptor descrito y éste se une con más afinidad a la IL-17^a que a la IL-17F en humanos (186). Se cree que el receptor IL-17RA se expresa en el tejido hematopoyético, células mieloides, células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos. A diferencia de otros receptores de citocinas, las subunidades del IL-17RA son preensambladas en la membrana plasmática antes de unirse a su ligando respondiendo más rápido y de forma específica a su ligando. La transducción de señales por la IL-7 culmina en la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) que constituye el puente molecular entre la inflamación y el cáncer resultando crucial para la acción de IL-17 favoreciendo el desarrollo de la inflamación crónica intraprostática (187).

La IL-17 ha sido implicada en enfermedades autoinmunes que incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiples, alergias en la piel, la psoriasis, el rechazo en trasplantes de órganos, y el proceso inflamatorio en los infartos (188). Esta asociación de IL-17 con enfermedades inflamatorias crónicas sugiere un papel en la carcinogénesis y en el crecimiento tumoral promoviendo el desarrollo de cáncer a través de una mayor proliferación celular, actividades anti apoptóticas y una mayor angiogénesis (189).

Se ha demostrado que la IL-17 promueve el desarrollo de cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, mayor invasión celular en el cáncer de mama, cáncer de vejiga, y en el CaP (190). La inflamación crónica está implicada en el papel protumorgénico de la IL-17 de tal forma que se ha visto que los anticuerpos anti-IL-17 consiguen disminuir la inflamación y retrasar la aparición de diferentes tumores. Entonces, la IL-17 promovería esa formación como hemos dicho con el crecimiento de los tumores nombrados (188).

En el CaP los macrófagos y neutrófilos están en relación con la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) constituyendo como producto la IL-17 en el adenocarcinoma prostático. Vykhovanests et al. indicaron que la acumulación de IL-17 que expresan los macrófagos y neutrófilo, presentan niveles más altos en las lesiones de PIA. Así las zonas de tejido prostático tumoral, las lesiones de PIA y las áreas benignas no afectadas por PIA presentan microambientes diferentes (187).

El primer informe de la presencia de un receptor similar a IL-17R en células de próstata fue en 2002, posteriores estudios confirmaron que la expresión de IL-17A era baja en las células de próstata normales, mientras que estaba elevada en el 58% de las células cancerosas (al igual que los receptores de IL-17RA e IL-17RC que se expresan en el CaP), y el 79% en las células de HBP. Posteriormente sobre el IL-17-RC se informaron varias isoformas tanto en los CaP dependientes de hormonas como en los independientes (191). Estudios en modelos murinos indican que la que la promoción del CaP mediada por IL-17 puede ocurrir a través de la transición epitelial a mesenquimal a través de la de metaloproteinasas 7 (MMP7). Este mecanismo es concordante con una transformación progresiva de las células de CaP expuestas a la inflamación crónica mediante el reclutamiento de células inflamatorias por IL-17 y, en última instancia, una pérdida de adhesión. La invasividad mejorada a través de la expresión de metaloproteinasas les permite digerir la MEC, así como la membrana basal y así expandirse y mediante el eje de señalización de IL-17-MMP7 se produciría la transición de una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) a un adenocarcinoma de próstata (190).

Son muchas las investigaciones que parecen demostrar que la familia IL-17 puede influir en el desarrollo de HBP y en el CaP. Se ha demostrado que los niveles de las células Th 17 aumentan durante el desarrollo tumoral. Sin embargo, hay estudios que demuestran como los niveles de expresión de IL-17A, IL-17F e IL-17RC fueron más altos en CaP de grado inferior, en grado histológico de Gleason 6 y 7, lo cual sugiere que aquellos pacientes con CaP con mayor expresión de IL-17A, IL-17F e IL-17RC tienen un mejor pronóstico que los pacientes cuyas células cancerosas no expresan estas interleucinas (192). Cuando la IL-17 se une al IL-17RB en el estroma prostático su sobreexpresión se relaciona con altos grados de Gleason (193).

La IL-17 promueve el desarrollo de adenocarcinomas de próstata invasivos en condiciones de castración, potencialmente mediante la creación de un microambiente tumoral pro-angiogénico. Esta citocina promueve la formación y el crecimiento de adenocarcinoma de próstata sin hormonas, datos que sugieren que bloquear la señalización de IL-17 a través de intervenciones farmacológicas puede tener potencial en la prevención y el tratamiento de CPRC (194). Por todo lo anterior, el eje IL-17/IL-17R se convierte en un objetivo inmunoterapéutico prometedor en el manejo del CaP (191).

1.7.3 NFk β 1

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFk β) es un factor de transcripción principal inflamatorio del ADN responsable de regular la expresión de muchos genes para la respuesta inmune, adhesión celular, diferenciación, proliferación, angiogénesis, regulación de la supervivencia, y la apoptosis (195).

Una proteína identificada por Sen y Baltimore en 1986 (196) que posteriormente se observó en el citoplasma de las células animales, y que se encuentra implicado en la respuesta celular frente a agentes infecciosos, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 o TNF- α), estrés, radiación ultravioleta, factores de crecimiento y señales liberadas por células necróticas (197). Además su funcionamiento adecuado interfiere en la transcripción de múltiples genes, factores de crecimiento (FG), moléculas de adhesión, proteínas de fase aguda y se ve como tiene su importancia en cuanto a la regulación de las citocinas humanas, siendo esencial en la regulación de la transcripción de dichas proteínas inflamatorias (198).

La familia NFk β consta de cinco subunidades: p65 (RelA), RelB, c-Rel, **p50 (NFk β 1)** y p52 (NFk β 2). A diferencia de las otras subunidades, NFk β 1 y NFk β 2 se sintetizan como precursores (p105 y p100) que se escinden tras sufrir un procesamiento proteolítico a las formas maduras p50 y p52, respectivamente. Los factores de transcripción NFk β son dímeros formados prácticamente por cualquier combinación de los cinco miembros de la familia. Las subunidades NFk β se mantienen inactivas en el citoplasma por el inhibidor de las proteínas k β (Ik β). Una vez que la célula es estimulada por FG, citocinas... la activación de NFk β se produce la fosforilación de las proteínas Ik β por el complejo quinasa de Ik β (complejo Ikk) provocando su degradación. Así el dímero NFk β se transloca al núcleo produciéndose acetilación y fosforilación que lo activa regulando la transcripción de numerosos genes. Entre ellos, la forma principal de NFk β es un heterodímero de las subunidades p50/p105 y p65/RelA que están codificadas por los genes NFk β 1 y NFk β 2 respectivamente (199).

La familia de factores de transcripción NFk β tiene un papel esencial en la inflamación y la inmunidad, también descrito como regulador de la proliferación y supervivencia celular reconociéndole cada vez más como un factor clave en muchos pasos del inicio y de la progresión del cáncer. Existen tumores en los que el NFk β se encuentra mal regulado

siendo así que si el NF κ B se encuentra activado e induce aquellos genes que evitan la proliferación celular y protegen a la célula. Importante su papel con el control de varios genes implicados en la inflamación. Los defectos de NF κ B producen apoptosis conduciendo al aumento de muerte celular, ya que el NF κ B regula genes antiapoptóticos lo que proporciona un mecanismo de supervivencia celular para resistir el estrés fisiológico que desencadenó la respuesta inflamatoria (200).

La contribución de la inflamación en general y del NF κ B en particular al inicio y progresión del cáncer es múltiple y compleja. Ejemplo de esta complejidad la vemos en el papel de NF κ B en el cáncer de hígado. Los tumores asociados con la inflamación crónica parecen requerir NF κ B dentro de los hepatocitos como factor de supervivencia anti apoptótico. Sin embargo, en ciertos tipos de cáncer de hígado inducido químicamente, el NF κ B en el hepatocito actúa por el contrario como supresor de tumores. En general, la actividad aberrante de NF κ B parece tener un papel importante como cofactor en tumores sólidos al actuar como factor de supervivencia para las células transformadas, que de otro modo se volverían apoptóticas. Esta elevada actividad de NF κ B se logra mediante la liberación continua de citocinas por parte de los macrófagos en el microambiente tumoral (201). Además del papel de NF κ B para la supervivencia de las células cancerosas o la respuesta de las células inmunes al cáncer, recientemente se ha demostrado que NF κ B se activa en las células madre cancerosas, donde puede promover un entorno proinflamatorio inhiben la apoptosis y estimulan la proliferación celular. Las células madre cancerosas comprenden sólo una subpoblación menor de células cancerosas y se cree que intervienen en el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia (202).

NF κ B coopera con muchas otras moléculas y vías de señalización, así junto con el transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3) regulan de forma cooperativa varios genes diana, incluidos genes antiapoptóticos y de control del ciclo controlando sinérgicamente genes que codifican citocinas. Se vio como NF κ B1 y NF κ B2 interactúan físicamente con STAT3, facilitando el reclutamiento de NF κ B a los promotores de STAT3 y viceversa afectando la actividad de NF κ B. La inflamación crónica da como resultado una actividad constitutiva elevada de NF κ B y una liberación de citocinas como IL-6, que por sí misma activa STAT3. Sin embargo, STAT3 también puede tener una función supresora de tumores observado para el cáncer intestinal, donde afecta la actividad de otros miembros de la familia STAT y la expresión de moléculas de

adhesión celular. Por último, el NFκβ también puede contribuir a la progresión tumoral controlando la vascularización de los tumores mediante la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (201).

El gen humano NFκβ1 (p105/p50), comprende 24 exones y se encuentra ubicado en el cromosoma 4q24, codifica una proteína de unión al ADN de 50 kDa que puede actuar como un regulador maestro de la inflamación y el desarrollo del cáncer (195).

NFκβ1, una de las cinco subunidades de NFκβ, ampliamente implicada en la carcinogénesis, en algunos casos impulsa la progresión del cáncer y en otros actúa como supresor de tumores. La complejidad del papel de esta subunidad radica en las múltiples posibilidades de combinación dimerica, así como en los diferentes cofactores que interactúan, que dictan si la transcripción génica está activada o reprimida de una manera específica de células y órganos (199).

La implicación de NFκβ1 en la carcinogénesis como supresor de tumores se encuentra en la consideración que los homodímeros p50 reprimen la transcripción de genes, amortiguan las respuestas inflamatorias y anulan la señalización antiapoptótica encontrándose que en diferentes líneas celulares se inhibe el crecimiento tumoral mediante una mayor generación de p50 reduciéndose así dicho crecimiento (203). En otros casos un aumento en los heterodímeros p50: p65 unidos al ADN conduce a una mayor expresión de genes regulados por NFκβ, como los proinflamatorios, antiapoptóticos y proliferativos, actuando como un promotor tumoral, como ocurre en el cáncer colorrectal (199).

Los polimorfismos de NFκβ1 se han asociado en gran medida con defectos inmunitarios, existiendo una vinculación con un mayor o menor riesgo de cáncer en varias poblaciones y tipos de cáncer diferentes. Se han sugerido polimorfismos en el gen de NFκβ1 como factores de riesgo para el desarrollo de varios cánceres como el cáncer de hígado, gástrico y ovario, no siendo así en el CaP (204). Es así como investigadores han estudiado la etiología de la oncogénesis y han identificado la relación entre el polimorfismo genético y el riesgo de cáncer, especialmente para el polimorfismo del promotor NFκβ1-94*ins* / *del* (inserción /delección) ATTG y el cáncer de ovario, el carcinoma oral de células escamosas y el carcinoma nasofaríngeo, no encontrando asociación en el CaP (195). Otros estudios realizados sobre el CaP y la asociación con el polimorfismo NFκβ1 -94 *ins/del* ATTG (que codifica la subunidad p50) en población china se encontró una asociación

significativa del *alelo del* con un menor riesgo de CaP; es así como el *alelo del* podría disminuir el nivel de transcripción aproximadamente a la mitad y a su vez reducir la traducción de proteínas, lo que resulta en una menor producción de p50 (NFκβ1). Dado que p50 juega un papel en la inflamación, los sujetos que tenían menos proteína (es decir, los que portaban el *alelo del*) tenían un nivel reducido de inflamación teniendo en cuenta que la inflamación está relacionada positivamente con la carcinogénesis de próstata. El *alelo ins* activa la transcripción dando lugar a niveles elevados de NFκβ1, aumentando los niveles de inflamación e incrementando los niveles de riesgo de CaP. En conclusión se ve como los polimorfismos en el gen NFκβ1 puede modular el riesgo de desarrollar CaP (205).

Con lo anteriormente descrito hemos visto como las vías en las que interviene el NFκβ se encuentran en el inicio y progresión del CaP. Se demostró que en las líneas celulares independientes de andrógenos PC3 y DU145 el NFκβ se encuentra activo y aumenta constituyendo una vía de supervivencia para dichas líneas celulares, mientras que la línea celular del CaP sensible a andrógenos LNCaP tiene un nivel bajo de NFκβ. Este factor de transcripción en su progresión del CaP regula la expresión de PSA, un marcador clínico importante de dicha progresión (206). En cuanto a la recidiva bioquímica estudios observan que el PSA, el Gleason y el NFκβ nuclear fueron predictores independientes de recidiva bioquímica, indicando que la que la localización nuclear de NFκβ es un factor pronóstico que predice de forma independiente un alto riesgo de dicha recidiva en el CaP. Otras investigaciones en pacientes con CaP señalan que los márgenes quirúrgicos positivos en las muestras de prostatectomía, la localización nuclear de NFκβ se asoció con un alto riesgo de recidiva bioquímica viendo también que la mayoría de las metástasis en los ganglios linfáticos del CaP tenían una tinción nuclear evidente con NFκβ. Algunos estudios encuentran diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre bioquímica en función de la expresión de NFκβ sugiriendo la potencial relevancia biológica de este marcador (207).

Muchos estudios han descrito la activación constitutiva de NFκβ en diversos tumores como el de ovario, mama y gástricos, pero no son tantas las investigaciones en el CaP. La sobreexpresión de NFκβ nuclear en el CaP se ha relacionado con tumores de fenotipo más agresivo, metastásicos (208) y está implicada en la quimio y radio resistencia (207).

Así la inhibición de NFκβ se podría ver como una estrategia de investigación para el tratamiento del CaP dado su control en muchos genes implicados en la inflamación, y

potenciar el efecto de los antineoplásicos de los agentes quimioterápicos. Con todo, el papel fundamental que desempeña NFκβ1 en la carcinogénesis todavía no se ha conseguido entender completamente requiriendo más estudios para delinear el papel de NFκβ1 en el CaP y en su progresión (199)

1.7.4 STAT3

Las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT), y en particular STAT3, es una oncoproteína que interviene en múltiples vías de señalización, regula la señal de transducción desde el espacio extracelular al núcleo por medio de una vía canónica que implica su fosforilación en Tyr705 (pY705-STAT3) en respuesta a la activación de citoquinas, factores de crecimiento y otras oncoproteínas. Si bien su activación es rápida y transitoria en las células normales, se encontró que STAT3 se activa de una forma permanente en las células tumorales, lo que promueve una síntesis alterada de proteínas clave responsables del inicio y progresión de la carcinogénesis (BIRC5 y MCL1, proteínas antiapoptóticas; P21 y c-MYC, reguladores del ciclo celular; VEGF, factor angiogénico) (209)

Las cinasas Janus (JAK) y STAT3 se encuentran entre las nuevas dianas más prometedoras para la terapia del cáncer. Además de la interleucina-6 (IL-6) y sus miembros familiares, recientemente se identificaron múltiples vías, incluidos los receptores acoplados a proteína G (GPCR), los receptores tipo Toll (TLR) y los microARN para regular la señalización JAK-STAT en el cáncer. Bien conocida por su papel en la proliferación, supervivencia, invasión e inmunosupresión de células tumorales, la señalización JAK-STAT3 también promueve el cáncer a través de la inflamación, la obesidad, las células madre y el nicho premetastásico. Además de ser un factor de transcripción en el cáncer, STAT3 regula las funciones de la mitocondria, así como la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos (210). En particular, la fosforilación en Ser727 (pS727-STAT3) induce la localización de STAT3 en las mitocondrias, donde puede regular la fosforilación oxidativa, pS727-STAT3, junto con la glutationilación de STAT3 en los residuos Cys328 y Cys542, parecen estar relacionados con un mayor estrés oxidativo y asociado a presencia de cánceres más avanzados (211).

Esta oncoproteína realiza sus múltiples actividades biológicas a través de dos patrones de señalización intracelular principales conocidos como las vías canónica y no canónica. En la vía canónica, la fosforilación de STAT3 en Y705 impulsa su actividad oncogénica a través de su homodimerización y translocación nuclear. Como factor de transcripción, STAT3 regula directamente la expresión de una amplia gama de genes, muchos de los cuales desempeñan funciones clave en la oncogénesis. La vía no canónica abarca varias funciones que son independientes de su fosforilación en Y705 (212). Estas actividades biológicas se resumen a continuación:

- STAT3 no fosforilado (U-STAT3) puede unirse a la secuencia activada por interferón γ (GAS), ya sea como dímero o como monómero. U-STAT3 regula la expresión génica a través de su unión a secuencias de ADN ricas en AT e impulsa la remodelación de la estructura de la cromatina (213)
- La fosforilación de STAT3 en S727, en lugar de Y705, es necesaria para su actividad mitocondrial (214); controla la respiración y el metabolismo celular mejorando la actividad de succinato oxidoreductasa (complejo II), ATP sintasa (complejo V) y lactato deshidrogenasa. Al afectar en el equilibrio entre los metabolismos glucolítico y de fosforilación oxidativa, STAT3 favorece el cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica conocido como efecto Warburg (215)
- Se asocia con una variedad de estructuras citosólicas, incluidas adherencias focales, microtúbulos y husos mitóticos, jugando un papel importante durante el ensamblaje de las redes del citoesqueleto, como los filamentos de actina y los microtúbulos, promoviendo así la migración e invasión celular (216).

STAT3 representa una proteína central en la intrincada red de vías intracelulares y sus diferentes modificaciones postraduccionales (PTM)(p-Y705, p-S727, Ac-K685 y Glut-C328 / C542) orquestan su actividad pleiotrópica, reflejando estados celulares específicos como inflamación o estrés oxidativo (217).

Al igual que STAT3, el factor de transcripción NF κ B se activa de forma aberrante en muchos tipos de cánceres, donde regula, entre otros, los genes implicados en la proliferación, migración e invasión de células tumorales. Es importante destacar que se sabe que STAT3 se une directamente, a través de su dominio de unión al ADN, al dominio de transactivación de NF κ B (218), y esta interacción juega un papel clave en el control de la interacción entre la célula maligna y su microambiente, en parte a través de la

inducción de ciertos subconjuntos de genes que requieren la cooperación entre los dos factores de transcripción (219). Es de destacar que algunas de las proteínas de unión a STAT3 también interactúan directamente con NFκB (220). Por lo tanto, apuntar a tales moléculas, además del efecto sobre los genes regulados por STAT3, podría ayudar a inhibir la interacción/intercomunicación STAT3/NFκB y las actividades oncogénicas relacionadas (221).

Uno de los genes supresores tumorales suprimidos o mutados con mayor frecuencia en el CaP, es el Pten, con una incidencia estimada del 70% en el CaP metastásico; esta supresión o mutación provoca una activación aberrante de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR (222) y conduce a la senescencia, la cual está regulada por la vía ARF-p53 (223), la inactivación concomitante de Pten y p53 conduce a un fenotipo maligno de CaP; ahora se conoce que la pérdida de señalización del eje IL6/STAT3, en modelo de CaP deficientes en Pten, acelera la progresión del cáncer que conduce a la aparición de metástasis (224).

La pérdida de la señalización de IL6/STAT3 en el CaP interrumpe el eje supresor de tumores ARF-Mdm2-p53; es por ello que se consideran STAT3 y su ARF diana transcripcional como nuevos y potentes marcadores de pronóstico, debido a que la pérdida de expresión de los mismos se correlaciona con mayor riesgo de recurrencias bioquímicas, progresión del tumor, formación de metástasis y pronósticos más precarios (225).

Se ha trabajado sobre bloqueadores de señalización IL6/STAT3, pero su uso ha de ser muy cauteloso ya que al parecer pueden convertir los tumores de bajo grado en cánceres altamente malignos, por la pérdida de la senescencia controlado por dicho eje. Otra línea sobre la que se trabaja sería que la reactivación de la IL-6/STAT3/ARF pueda ser una estrategia para posibles tratamientos (226)(227).

Existen fármacos como la Galiellalactona (228) con acción inhibidora sobre STAT3, que frena el crecimiento tumoral y su diseminación metastática, observándose acción tanto en el entorno supresor de los tumores como en las células tumorales de forma directa; así mismo parece tener efecto sobre el comportamiento de las células mieloides tumorales, interrumpiendo importantes factores inmunosupresores y promotores de tumores derivados de monocitos y las propias células tumorales (229).

En estudios recientes, Jie Luo y cols. (230) dirigidos al eje RA/lncRNA-p21/EZH2/STAT3, utilizaron los inhibidores de EZH2 (potenciador de histona metiltransferasa de Zeste Homolog 2) los cuales promueven la transcripción de lncRNA-p21 mediante la alteración de la unión del receptor de andrógenos (RA) a diferentes elementos de respuesta de andrógenos, que cambian la función EZH2 de histona-metiltransferasa a no histona metiltransferasa, en consecuencia metilando el STAT3, lo cual parece promover la diferenciación neuroendocrina de los tumores (230)

1.7.5 Factor de choque térmico 1 (HSF-1)

Las proteínas de choque térmico (HSP) se descubrieron por primera vez como un grupo de proteínas inducidas en bloque por el choque térmico y otras tensiones químicas y físicas, que posteriormente se caracterizaron como chaperonas moleculares, proteínas que tienen en común la propiedad de modificar las estructuras e interacciones de otras proteínas (231).

Las proteínas del factor de choque térmico (HSF) interactúan con los promotores de muchos genes HSP y aseguran una activación transcripcional rápida en situaciones de estrés seguida de una desactivación igual de rápida tras la recuperación (232); la familia de genes *hsf* incluye HSF1 (*hsf1*), el coordinador molecular de la respuesta al choque térmico, así como otros dos genes, *hsf2* y *hsf4* (233).

El factor de choque térmico 1 (HSF1) es un factor de transcripción expresado de manera ubicua que es crucial para la homeostasis celular y la protección contra el estrés que daña las proteínas. En células no estresadas, HSF1 está presente principalmente en complejos con una masa molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, incapaces de unirse al ADN. El tratamiento térmico induce un cambio en la masa molecular aparente de HSF1 a aproximadamente 700 kDa, concomitante con la adquisición de la capacidad de unión al ADN. El HSF1 inactivo reside en el citoplasma de las células humanas; al activarse, se transloca rápidamente a una fracción nuclear soluble y poco después se asocia con el sedimento nuclear. En el choque térmico, HSF1 activable, que ya podría haber sido modificado postraduccionalmente en la célula no estresada, sufre una modificación adicional (234). Tras la exposición al calor, HSF1 se trimeriza, se une al ADN y se fosforila en varios aminoácidos. Aunque la hiperfosforilación de HSF1 está asociada con su transactividad, varios aminoácidos también se fosforilan en ausencia de estrés y

reprimen la activación de HSF1. Hasta la fecha, se ha demostrado que solo la fosforilación de S230 y S326 aumenta la capacidad transcripcional de HSF1 (235).

Este factor juega un papel fundamental en la protección de la estabilidad del proteoma o proteostasis por inducción de proteínas de choque térmico (HSP). Si bien HSF1 permanece latente en su mayor parte en las células normales no estresadas, es constitutivamente activo en las células malignas (236) para así fomentar la proliferación y la supervivencia ante estímulos oncogénicos afectando a la oncogénesis, la progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento al preservar la proteostasis del cáncer, lo que sugiere la interrupción de la actividad de HSF1 como una posible estrategia contra el cáncer ya que parece que reduce la proliferación y supervivencia de las líneas celulares de cáncer humano (237). Grandes estudios de cohortes han identificado la presencia de HSF1 como un marcador principal de mal pronóstico en una amplia variedad de cánceres y han correlacionado altos niveles de HSF1 y su localización nuclear con metástasis (238).

La propiedad oncogénica de HSF1 proviene de la activación de distintos programas transcripcionales, incluidos los procesos de soporte oncogénico como la regulación del ciclo celular, el metabolismo, la adhesión y la traducción, tanto en las células cancerosas como en el estroma tumoral. La relevancia clínica se demostró en el carcinoma de mama, pulmón y hepatocelular, donde una alta expresión de ARNm y / o proteínas se correlaciona con un mal pronóstico (239). Se ha demostrado que HSF1 promueve la invasión en líneas celulares de cáncer de próstata y se ha detectado una expresión elevada en líneas celulares de cáncer (240). Parece además que presenta una dependencia androgénica total en su regulación y abre un camino para investigar este factor en pacientes con CaP tratados con TDA (241). La expresión de los oncogenes herregulina beta1 y Ras activan HSF1, y así, protege a dichas células contra la apoptosis y permite el crecimiento independiente del anclaje (242). HSF1 orquesta una amplia red de funciones celulares que actúan globalmente para apoyar la oncogénesis. Dependiendo de la naturaleza del estímulo oncogénico, HSF1 potencia la proliferación y/o supervivencia celular, modula las dos principales cascadas de transducción de señales que promueven el cáncer, las rutas RAS/MAPK y cAMP / PKA, y probablemente afecte a muchas más; mantiene una biogénesis ribosómica eficiente y la activación de p70 S6K en condiciones limitadas por el factor de crecimiento. Que son particularmente relevantes para estados malignos; y por último, HSF1 promueve la glucólisis, una vía metabólica clave para el

crecimiento y la supervivencia del tumor; individualmente cualquiera de estos efectos por sí solo no tendría grandes efectos en la transformación maligna; sin embargo parece que este factor produce todas estas actuaciones en conjunto, incluso otras aún en estudio, ya que también parece ser que no sólo tiene acción sobre el inicio de la célula tumoral, si no también promueve su mantenimiento; así por ejemplo, si bien la eliminación del factor no tiene grandes efectos en la células humanas normales, si produce un gran compromiso en las líneas celulares malignas y premalignas (237).

Ferrari N. y cols. (243) han observado que HSF1:

- mantiene altos niveles de DKK3 (factores promotores de tumores impredecibles debido a sus actividades inmunosupresoras) en el estroma
- potencia la señalización de Wnt en los CAF
- reduce la degradación de YAP / TAZ

Qiong Wang y cols. (244) estudiaron en 121 muestras de cáncer de cavidad oral de tipo escamoso la expresión de HSF1 en las células tumorales observando su correlación significativa con el grado patológico, la recurrencia y la muerte, y como la alta expresión de HSF1 en las células cancerosas tuvo un impacto pronóstico significativamente malo en los resultados de supervivencia, coincidiendo con otros estudios que muestran que la expresión de HSF1 fue mayor en los tejidos tumorales que en los tejidos normales y que la alta expresión de HSF1 nuclear se relacionó significativamente con el tamaño del tumor y el grado histopatológico, también encontraron que la alta expresión de HSF1 en las CAF estromales tenía una estrecha relación con la recurrencia y la mortalidad en estos pacientes, determinándose como un factor pronóstico independiente en los análisis de regresión multivariante. Todo esto parece indicar que HSF1 tiene un papel importante en la regulación de la interacción entre el estroma y las células cancerosas para facilitar la progresión del tumor (244).

En cuanto a los estudios sobre cáncer de próstata, el aumento de la expresión está relacionado con mayor progresión y aparición de metástasis (245) así como con una respuesta deficiente al tratamiento, lo que sugiere que la expresión de HSP está involucrada en los mecanismos de progresión tumoral así como en el desarrollo de resistencia al tratamiento (246).

Estos hallazgos abren vías de posibles dianas terapéuticas, como por ejemplo antagonizar la expresión de HSP inducible por calor con quercitina, un fármaco bioflavonoide que

inhibe la activación de HSF1, o mediante el uso de oligonucleótidos dirigidos contra el ARNm de HSP70, ambas acciones sensibilizarían a las células tumorales a la apoptosis lo que conduce a la regresión tumoral(247).

1.7.6 Hsp72/HSPA1A

Estas proteínas de choque térmico se localizan en varios compartimentos subcelulares y están involucradas en múltiples procesos biológicos que incluyen la transducción de señales, apoptosis, senescencia, autofagia e inmunorespuesta asociándose a cánceres, enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias, teniendo entonces las Hsp funciones clave en la respuesta al estrés celular y la modulación inmunológica (248).

Las Hsp se clasifican en 2 familias, la familia de las chaperoninas (Hsp60, Hsp10, Hsp70 y Hsp90), y la familia de las nucleoplasminas (proteínas nucleares o nucleosomas). La familia de las Hsp-70 es la más conservada en la evolución especialmente en su dominio N-terminal (ATPasa) y en el sitio de unión al sustrato. En mamíferos la familia Hsp-70 está compuesta por 5 miembros, con un tamaño aparente de 70 kDa codificados por 5 genes distintos. Dichos miembros son: GRP-78, GRP-75, HSC-73, HSP-72 y HST-70 (249). La proteína Hsp-72 (codificado por el gen HSPA1A) se denomina también genéricamente Hsp-70 por ser la más representativa y la más abundante de la familia. Se suele expresar a muy bajo nivel en situaciones normales, induciéndose fuertemente en respuesta al estrés, por ello se le llama proteína inducible (250). Las proteínas recién sintetizadas bajo condiciones de estrés no pueden adoptar un plegamiento adecuado y permanecen unidas a la Hsp-70, la cual puede presentar las proteínas en conformaciones incorrectas a los lisosomas celulares para su posterior degradación (251). Los genes que codifican proteínas de estrés poseen en sus promotores una secuencia altamente conservada, activadora en la transcripción. Esta secuencia, conocida como HSE (“heat shock element”), regula la expresión de estos genes por unión de factores de transcripción conocidos como HSFs (“heat shock factor”). En mamíferos se han identificado dos HSFs distintos, HSF-1 y HSF-2. El factor HSF-1 está presente en el citoplasma en forma monomérica o formando complejos con otras proteínas. Tras un factor de estrés, se homotrimeriza, se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas (HSES) en el promotor de los genes Hsp, promoviendo así su expresión siendo el HSF-1 responsable mayoritario de la respuesta celular a estrés (252). Las proteínas de la familia de Hsp70 tienen múltiples

funciones y algunas de ellas están claramente implicadas en la mediación de la respuesta a estrés dependiente de HSF1 y los efectos anti-apoptóticos, así como en el plegamiento de proteínas post-traslacional y el tráfico de proteínas y de su degradación (253). Las Hsp72 se consideran mediadoras en la respuesta inflamatoria. Estas proteínas son liberadas al espacio extracelular actuando como moléculas marcadoras de señal intracelular para realizar su efecto proinflamatorio. Por ello, deben actuar sobre receptores de membrana celulares. El receptor antigénico CD14, conocido como el receptor de lipopolisacáridos de origen bacteriano en monocitos, ha sido identificado como el receptor para Hsp70 que al unirse estimula la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Así Hsp72, añadido de forma exógena a las células estimula la producción de dichas citocinas proinflamatorias por las células presentadoras de antígeno (254). Las Hsp se expresan en niveles elevados en muchos tumores como el cáncer de mama, endometrio, pulmón, colon, leucemias, CaP, y otros tipos, y su producción se relaciona frecuentemente con un aumento de la proliferación celular, metástasis en los ganglios linfáticos, mala respuesta a la quimioterapia y escasa supervivencia generando un mal pronóstico (255). Además de su ubicación intracelular, las Hsp también se encuentran en la membrana plasmática y en el espacio extracelular donde pueden activar el sistema inmunológico estando involucradas en los procesos de presentación de antígenos mediando las respuestas inmunitarias antitumorales describiendo la expresión de Hsp72 en células tumorales o células infectadas por virus es importante para la generación de respuesta inmune celular específica (256).

Estudios involucran a las Hsp en la capacidad de migración celular, paso importante durante el desarrollo neoplásico y las metástasis (255). La Hsp72 que en condiciones normales se expresa a niveles muy bajos se produce en niveles elevados por la transformación oncogénica en la mayor parte de las células tumorales (256), siendo capaz de promover la supervivencia de las células tumorales ejerciendo un papel anti-apoptótico capaz de suprimir la senescencia inducida por oncogenes permitiendo así la proliferación de células cancerosas al disminuir la actividad de p53/p21, y suscitar la autofagia como mecanismo de supervivencia celular (257). La asociación de Hsp72 con el desarrollo de cáncer se demostró en varios trabajos en los que la sobreproducción de Hsp72 promovió las propiedades cancerosas de las células, y observan como la actividad antiapoptótica de la Hsp72 juega un papel importante en el desarrollo de este. Hsp72 permite que las células cancerosas resistan la apoptosis causada por factores estresantes del microambiente

tumoral (258). El papel de las Hsp en el CaP es complejo, y su expresión se ha relacionado con la progresión y la agresividad del tumor siendo crucial la Hsp70 en la angiogénesis, invasión y metástasis de novo. Una faceta importante de las funciones de las Hsp en las células CaP es como la Hsp regula la señalización del RA. Así Hsp70 se une al dominio N-terminal del RA y modula la función del receptor en las células de CaP, estando la Hsp72 inducible involucrada en la formación temprana del complejo RA-chaperona, especialmente en el CPRC, produciendo la inhibición de Hsp72 una disminución en la actividad transcripcional del RA convirtiendo a Hsp72 en una interesante diana terapéutica (259). Se ha visto la elevación de los niveles de Hsp y de HSF1 en líneas celulares de CaP agresivamente malignas (256).

El efecto antiapoptótica de la sobreexpresión de Hsp72 está bien establecido en líneas de células tumorales de próstata PC-3 y DU-145, siendo estas células resistentes a la apoptosis inducida por radiación y química confirmando un aumento de Hsp72. Inhibiendo la apoptosis, por rutas apoptóticas dependientes e independientes de caspasas, la Hsp72 puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de tumores constituyendo un potente factor antiapoptótico promoviendo así el desarrollo del cáncer. Al promover el cáncer, la Hsp72 puede desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la viabilidad y la proliferación de las células cancerosas. De hecho, se demostró que el agotamiento de Hsp72 por el ARN antisentido de Hsp72 codificado por adenovirus provoca la muerte rápida de varios tipos de células tumorales, sin embargo, en otros estudios no se observó una muerte celular significativa como resultado directo del agotamiento de Hsp72. Así se ha visto como el aumento de la expresión de Hsp72 en el CaP es prescindible para su viabilidad, pero confiere resistencia a variedad de agentes contra el CaP (260). Además, se descubrió que Hsp70 potencia la estabilidad y activación de la proteína promotora de metástasis WASF3, aumentando así la metástasis y la invasión (261). Es importante como la sobreexpresión de Hsp70 hace que las células CPRC sean insensibles a la radioterapia y aumenta su resistencia a ciertos fármacos como etopósido, doxorrubicina, y cisplatino (259). Existen estudios que demuestran que la Hsp72 que se encuentra en el medio extracelular desempeña un papel importante en la regulación inmunitaria, sin embargo, el impacto de las terapias comunes contra el cáncer sobre la liberación extracelular de Hsp72 no está bien definido. Investigaciones proporcionan el hallazgo de que la radioterapia (RT) administrada de forma rutinaria en la clínica conduce a un aumento significativo de los niveles séricos de Hsp72 en pacientes

con CaP, presumiendo así, que la RT induce la liberación de Hsp72 de los tumores, y que este aumento se asocia con aumentos concomitante de citocinas proinflamatorias que incluyen IL-6 y TNF- α . Otros estudios examinan el papel potencial de la Hsp72 plasmática como biomarcador del CaP midiendo los niveles plasmáticos de Hsp72 en pacientes con CaP localizado/no tratado o resistente al tratamiento hormonal y comparando con pacientes control encuentran como los niveles plasmáticos de Hsp72 en pacientes con enfermedad localizada no tratada fueron significativamente más altos que los del grupo de control. No obstante, la Hsp72 plasmática no fue más eficaz que el PSA como predictor para el diagnóstico o estratificación de los pacientes en grupos de riesgo establecidos (262). Finalmente señalar el atractivo de como la supresión de Hsp70, que es muy necesaria y se expresa sustancialmente en las células cancerosas, es un enfoque atrayente para el tratamiento del CaP, especialmente en el CPRC; si bien son pocos los estudios que han investigado los efectos de la inhibición de Hsp70 en células de CaP requiriendo nuevas estrategias terapéuticas e inhibidores de la Hsp altamente selectivos para lograr resultados óptimos para los pacientes con CaP (259).

2. Hipótesis

El CaP, dada su incidencia y prevalencia, representa un importante problema de salud. El diagnóstico del CaP se basa en el tacto rectal y/o la determinación de PSA, si bien la especificidad de este marcador es baja. Es frecuente la repetición de determinaciones de PSA y la realización de varias biopsias ante la sospecha de tumor que se pueden asociar a comorbilidades para el paciente. Se han desarrollado múltiples herramientas de predicción preoperatoria y postoperatorias (tablas, nomogramas...) para intentar predecir la evolución del CaP, destacando, por ejemplo, las tablas de Partin, los grupos de riesgo d'Amico o los nomogramas de Kattan o Briganti. Sin embargo, ninguna de estas herramientas empleadas en la fase preoperatoria o incluso en el postoperatorio, con los datos de la pieza de la prostatectomía radical, tienen una alta fiabilidad pronóstica, no siendo posible por el momento definir con precisión el pronóstico de un paciente determinado con cáncer de próstata no metastásico. Además, muchos problemas subyacen en la naturaleza de los datos que se utilizan, no siempre concluyentes dada la dificultad del muestreo de la glándula y la heterogeneidad en la interpretación de los resultados que frecuentemente es dependiente del patólogo observador.

La búsqueda de biomarcadores es compleja, no hay buenos biomarcadores de CaP, pudiendo ser los marcadores tisulares útiles dado que el diagnóstico se basa en la biopsia de próstata para la obtención de tejido y su posterior análisis.

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

Es sabido que el estroma es un inductor del crecimiento y diferenciación del epitelio glandular prostático asociado a andrógenos, existiendo un mecanismo recíproco que también juega un papel central en la carcinogénesis y progresión del CaP. Así, la existencia de los denominados fibroblastos asociados a carcinoma (CAF) ha sido recientemente descrita en el CaP. En los últimos años se han determinado que algunos factores diferenciales estarían sobreexpresados en presencia de este estroma reactivo tumoral, analizando fibroblastos procedentes del estroma tumoral de pacientes con CaP.

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.

El cultivo de células procedentes de próstata humana tiene ventajas evidentes, destacando, además de un estudio más específico de las células afectadas, la posibilidad de contar con una reserva celular en la que pueden realizarse diferentes determinaciones, incluso en momentos posteriores al proceso evolutivo de la enfermedad que se analiza y la de realizar cocultivos con diferentes líneas celulares epiteliales y analizar la influencia de tratamientos en los medios celulares. En la Unidad de Investigación del Hospital de Jove se ha optimizado la técnica de extracción de fibroblastos y hemos comprobado la viabilidad del cultivo celular de los fibroblastos prostáticos en nuestro laboratorio.

Por todo ello, se ha planteado un estudio prospectivo de las muestras procedentes de pacientes sometidos a biopsia múltiple prostática por sospecha de CaP. La finalidad es comparar las características del estroma de las diferentes áreas de la zona periférica prostática en pacientes que finalmente sean diagnosticados de una neoplasia, diferenciando las zonas con tumor de las que no lo tienen. El análisis de algunos marcadores producidos en el estroma y seleccionados a partir de nuestro estudio previo permitirá conocer rasgos diferenciales de la carcinogénesis prostática. Pudiendo también tener una traslación a la clínica si se consiguen identificar marcadores pronósticos estromales, así como moléculas características de estos 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, obtuvimos una serie suficiente para responder a los objetivos que se expresan posteriormente.

3. Objetivos

1-Analizar la expresión de marcadores de inflamación de localización preferentemente estromal como **IL-6, Receptor de la interleucina 17, NFkβ1, STAT3, Hsp72/HSPA1A, HSF-1**; así como el comportamiento de marcadores de interacción estroma epitelio como **cadherina-11, CXCL14, CXCL12/SDF-1 y FAP**; todos ellos expresados en los fibroblastos peritumorales procedentes de tumores prostáticos humanos con diferentes características clínico-patológicas.

2-Determinar potenciales asociaciones de la expresión de dichos factores en tumores localizados.

3-Comparar su expresión en tumores localizados en relación con los carcinomas metastásicos, y ambos con la del tejido no tumoral.

4-Explorar sobre la posible utilidad de dichas sustancias como potenciales marcadores de recidiva bioquímica tras prostatectomía radical en tumores localizados.

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 cáncer de próstata. Se recogieron muestras de los diferentes grupos pronósticos dentro de los tumores localizados, así como muestras de pacientes metastásicos sin haber iniciado tratamiento de privación androgénica. Se compararon los resultados con los de las muestras no tumorales alejadas del tumor (control sano).

Tras obtener las muestras mediante biopsia transrectal de próstata, se enviaron al laboratorio para 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 realizó en la consulta de Urología según los protocolos correspondientes a las guías de la Asociación Europea de Urología.

4.1.1 Población de estudio

Criterios de inclusión

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

Criterios de exclusión

- Cáncer de próstata. 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.

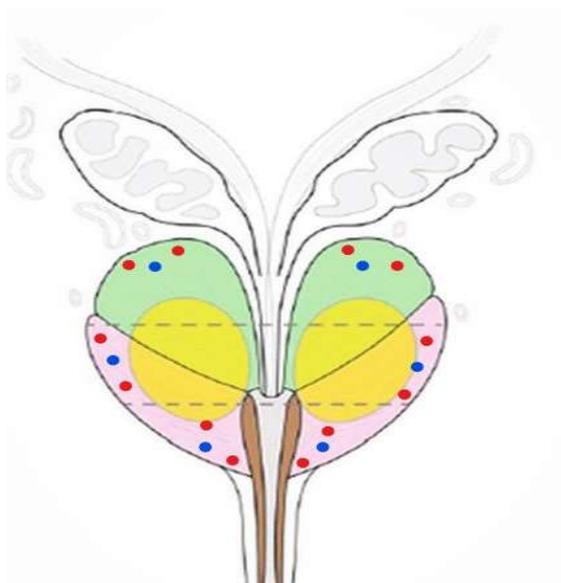
4.1.2 Métodos de obtención de muestras

Biopsia de próstata

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

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

Por tanto, de cada muestra prostática había 2 cilindros, uno para diagnóstico anatomopatológico y otro para cultivo celular. Todas estas muestras se recogieron en medios de cultivo apropiados para ser trasladados en pocas horas al laboratorio donde fueron procesadas.



● Muestras para diagnóstico anatomopatológico

● Muestras para nuestro estudio

Figura 6. Obtención de muestras pareadas para el diagnóstico y para nuestro estudio

Prostatectomía radical

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

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

4.1.3 Selección de las muestras válidas para el estudio.

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

Inicialmente se recogieron muestras de un mayor número de pacientes (81 casos). Algunos hubo que desecharlos por contaminación durante la obtención de esta o durante su procesado en el laboratorio. En el caso de los pacientes tumorales, se recogieron muestras de múltiples pacientes para seleccionar de manera equilibrada según los grupos de riesgo y con la confirmación de los datos de la pieza quirúrgica de prostatectomía radical. Los casos que no cumplen los criterios de selección fueron congelados para posibles estudios posteriores.

4.1.4 Obtención de los datos clínicos

Los datos clínicos y patológicos, tanto de la biopsia tumoral y de la pieza de prostatectomía radical, fueron recogidos en una base de datos específica en la que además se incluyeron parámetros del seguimiento para analizar la evolución de los pacientes con cáncer de próstata localizado tras el tratamiento radical que podrán ser evaluados en un estudio de supervivencia para analizar el tiempo libre de recidiva bioquímica. De esta manera, en todos los casos se recogieron los datos del paciente como la edad, el volumen prostático y el valor de PSA expresado en ng/ml. En cuanto a los parámetros tumorales se recogió el Gleason obtenido en la biopsia (Gleason primario y Gleason secundario), el estadio clínico -cT- y si había tumores múltiples. Se distinguió en ellos la localización del tumor del tejido sano lejano al tumor que sirvió como control (tejido sano no tumoral). Una vez realizado el tratamiento con intención curativa, en el caso de ser sometidos a prostatectomía radical, se registró de nuevo el Gleason primario y secundario, así como el estadio patológico -pT-, bordes afectos y afectación ganglionar patológica en caso de existir -pN-.

4.2 TÉCNICA DEL CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Las muestras fueron diseccionadas en piezas de 1mm² e incubadas en presencia de colagenasa A (1mg/ml) en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS (suero fetal bovino) durante 48h en atmósfera humedad a 37°C con 5% de CO₂. Tras la digestión las células fueron lavadas con PBS y crecidas en medio DMEM-F12 con 10% de FBS. Las células fueron cultivadas en población mixta hasta la selección de fibroblastos por Fluorescence Activated Cell Sorter” (FACS) con el marcador CD90 clon AS02. Se cultivaron aparte las células epiteliales, para su uso en co-cultivos con los fibroblastos; cultivos en pocillos separados por una membrana permeable a factores solubles. El cultivo puro de fibroblastos fue expandido en medio DMEM-F12 con 10% de FBS. Las células fueron incubadas en atmósfera humedad a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70%. La pureza del cultivo de los fibroblastos fue confirmada por la siguiente caracterización: vimentina, fibronectina y /o desmina positiva y alfa-actina negativa.

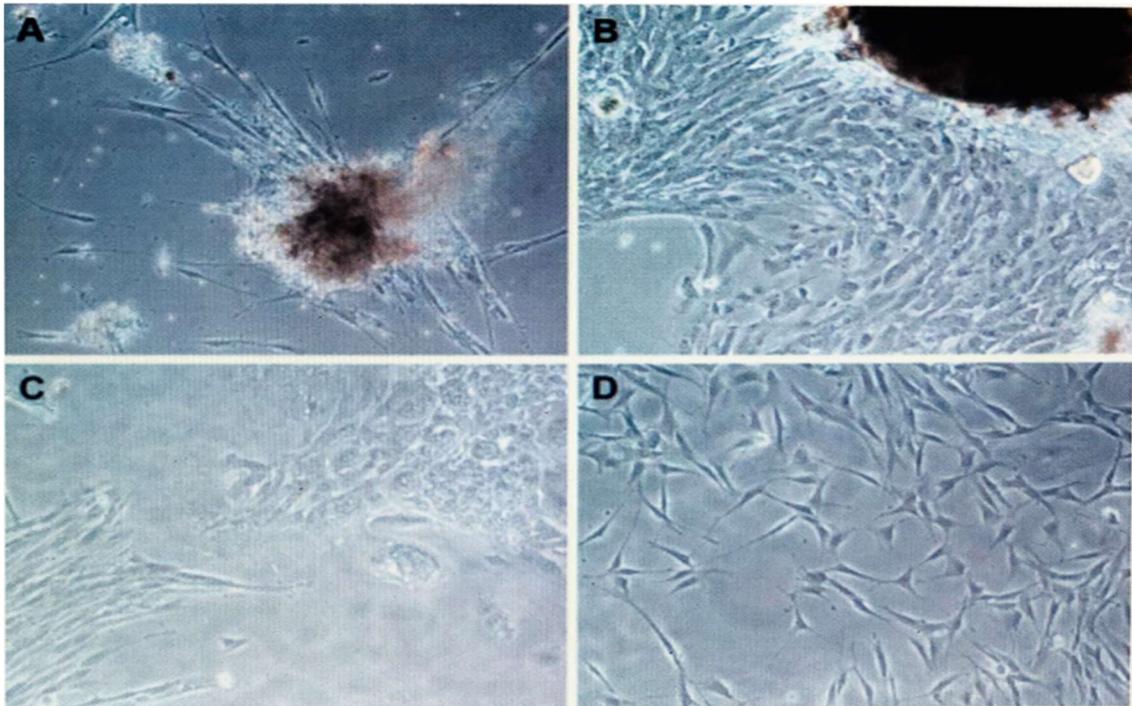


Figura 7. Imágenes de los cultivos de fibroblastos durante el proceso de aislamiento: A) 24 a 72 horas de aislamiento. B) Una semana después del aislamiento. C) Dos tipos celulares morfológicamente diferentes: las células en forma de huso corresponderían a los fibroblastos mientras que las células redondeadas corresponderían a células epiteliales o tumorales. D) Cultivo de fibroblastos puros (80),

4.2.1 Determinaciones moleculares

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

Marcadores de interacción estroma epitelio

1. Cadherina-11
2. CXCL14
3. Stromal Cell Derived factor-1 (CXCL12/SDF-1)
4. Fibroblast Activation Protein- α (FAP)

Marcadores de inflamación, de localización preferentemente estromal

5. IL-6
6. Receptor de la interleuquina 17
7. NFk β 1
8. STAT3 (stress oxidativo)
9. HSF-1
10. Hsp72/HSPA1A

El estudio de expresión génica se ha llevado a cabo mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa a tiempo real. Se utilizó un kit de extracción que permita la obtención de ARN y proteínas simultáneamente (Macherey-Nagel). La fase proteica fue conservada para su posterior uso. El ARN obtenido a partir de muestras tumorales se pasó a ADNc mediante retrotranscripción (High Capacity Cdna Reverse Transcription kit, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de los distintos factores se evaluó por PCR cuantitativa a tiempo real en un termociclador ABI PRISM® 7900 HT de Applied Biosystems, gracias a unos cebadores específicos de cada factor. La β -actina fue utilizado como *housekeeping gene* (calibrador interno de la muestra).

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

4.2.2 Aspectos éticos y de confidencialidad

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

4.2.3 Estudio estadístico

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

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

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

5. Resultados

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE

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

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

Las muestras obtenidas mediante biopsia de próstata transrectal (n30) se clasificaron según la suma de Gleason. La mayoría de los pacientes presentaron un Gleason score de 7 (n:11), de 8 (n:8) y de 6 (n:7); los scores de Gleason menos frecuentes fueron el 10 (n:1) y 9 (n: 3).

En los tumores localizados se presentaron las sumas de Gleason más bajas con siete casos de Gleason 6 y once casos Gleason 7; Además hubo 5 tumores con suma de Gleason de 8 (3+5) y uno de 9 (4+5) (tabla 2).

Tabla 2. Distribución del Score Gleason en los tumores localizados de la serie

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

Los 24 pacientes con tumores localizados se sometieron a prostatectomía radical como tratamiento primario. Se comparó el Gleason de la biopsia con el de la pieza de prostatectomía radical obteniendo los siguientes resultados (tabla 3), como se puede observar hubo 7 casos infradiagnosticados y 4 sobre diagnosticados en las biopsias.

Tabla 3. Concordancia entre los resultados de la biopsia y la pieza de prostatectomía

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

Finalmente, empleamos el Gleason score de la pieza de prostatectomía en los tumores localizados y el de la biopsia en los metastásicos que, tras el estudio histológico fueron sometidos a privación androgénica. Sin embargo, para realizar los análisis estadísticos, empleamos la clasificación ISUP (tabla 1, página 8) según la cual, los tumores se distribuyeron de la siguiente manera (tabla4):

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

De los 24 casos de pacientes con tumores localizados, 10 presentan tumores múltiples en los que se recogió muestra de ambos tumores, tejido tumoral 1 y tejido tumoral 2. Se realizó un análisis Chi² para valorar diferencias significativas entre el tipo de tumor, agrupándolos en 2 categorías, ISUP 1-3, ISUP 4-5; no se encontraron diferencias significativas (p:0,536), lo que nos permitió analizar únicamente la muestra del tumor más voluminoso en la pieza de PR, como el correspondiente a cada caso.

Tabla 4. Distribución de casos según la ISUP

		Prostatectomía	M+
ISUP	1	6	
	2	6	
	3	4	
	4	7	3
	5	1	3

La distribución por estadio se llevó a cabo a través de las muestras de PR (pT). Hubo pT2a (n 4), pT2c (n 14), pT3a (n 6) y ningún pT3b como se refleja en la siguiente tabla (tabla 5).

Tabla 5. Estadios pT, de las piezas de prostatectomía.

		n
pT	pT2a	4
	pT2c	14
	pT3	6
TOTAL		24

Solo 2 pacientes fueron pN1 en la muestra de linfadenectomía, si bien la misma se realizó únicamente en 7 de los 24 pacientes sometidos a linfadenectomía durante la PR (29,16%), dado que el resto no mostraban un riesgo elevado de presentar afectación extraprostática basado en los parámetros clínicos previos a la intervención (nomograma de Briganti).

Los tumores localizados 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 quirúrgico. En los tumores metastásicos, la mediana de seguimiento fue de 26 meses (12-78).

5.2 DETERMINACIÓN DE MARCADORES

En este apartado se analiza la expresión de los marcadores del estudio, comparando cómo varía esta expresión según el tipo de paciente:

- **Marcadores de interacción epitelio-estroma**
 1. Cadherina-11
 2. CXCL14
 3. Stromal Cell Derived factor-1 (CXCL12/SDF-1)
 4. Fibroblast Activation Protein- α (FAP)
- **Marcadores de inflamación, de localización preferentemente estromal**
 5. IL-6
 6. Receptor de la interleuquina 17
 7. NF κ B1
 8. STAT3 (stress oxidativo)
 9. HSF-1
 10. Hsp72/HSPA1A

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

Expresión de marcadores de fibroblastos de tumores localizados según PSA

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

Expresión de marcadores de fibroblastos de tumores localizados según estadio

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

Se observaron diferencias significativas en CXCL14 (0,005) en cuanto al estadio del tumor en la pieza de prostatectomía radical. Se objetivó que, a mayor estadio tumoral, menor expresión de CXCL14 (Figura 8).

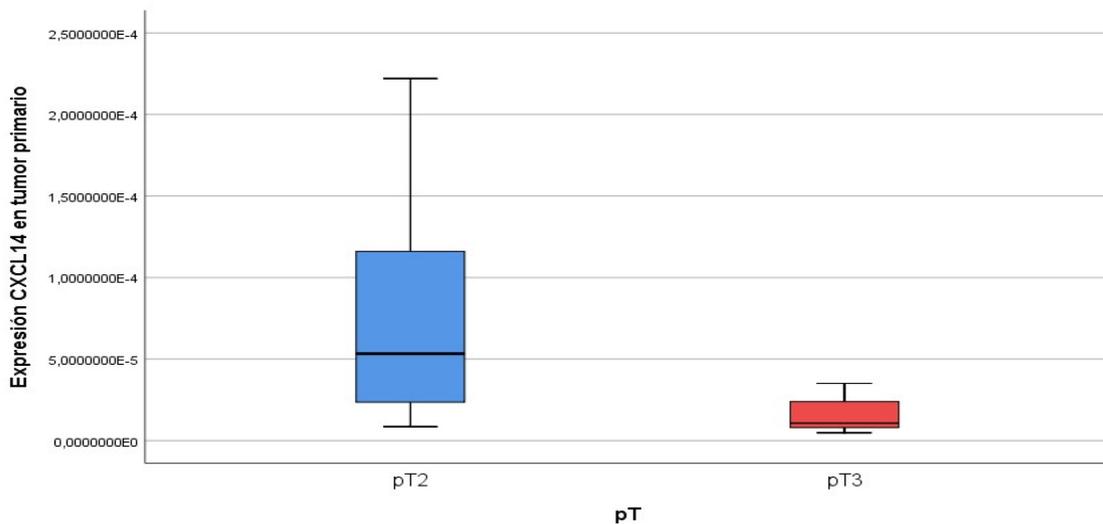


Figura 8. Expresión de CXCL14 en los CAF tumorales en relación al estadio pT.

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

Empleamos la misma metodología para el análisis del grado de la pieza de prostatectomía, agrupando los tumores en 2 grupos ISUP: menor de 3 (suma de Gleason de 3+3 y 3+4), que incluyó 12 casos; e ISUP de 3 o mayor (suma de Gleason de 4+3 y mayor), con otros 12. Se observaron diferencias significativas en los marcadores CDH11 (0,002) (fig.9) e IL6 ($p= 0,025$) (fig.10); Con ambos marcadores se observó que, a mayor Gleason, se produce una disminución de la expresión de estos factores.

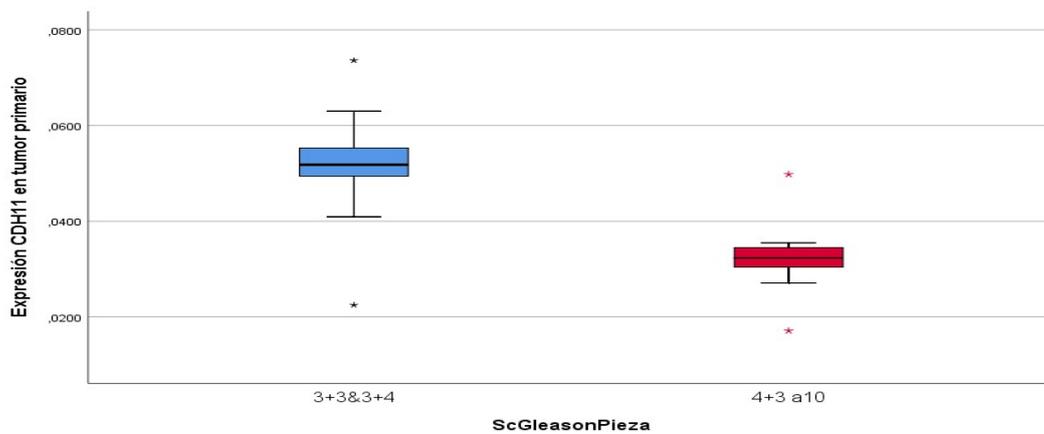


Figura 9. Correlación entre el Gleason y la expresión de CDH11.

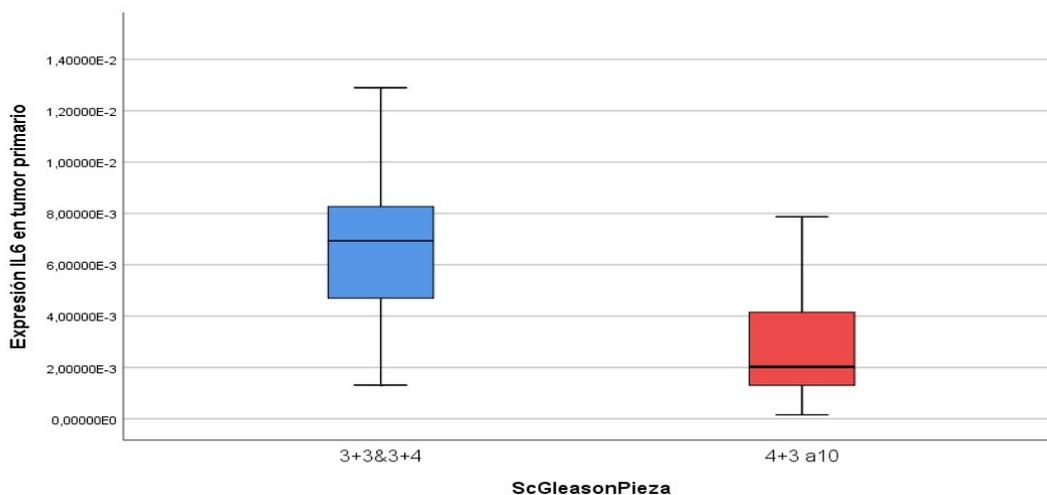


Figura10. Correlación entre el Gleason y la expresión de IL6.

5.2.2 Correlación en la expresión de los diferentes marcadores estudiados

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

- **CDH11** con las de CXCL14 ($p= 0,024$), NFkB1 ($p=0,004$), IL6 ($p= 0,019$) y STAT3 ($p= 0,006$) (fig.11)
- **CXCL12** con las de HSF1 ($p= 0,045$) (fig.12)
- **CXCL14** con las de IL6 ($p= 0,002$) y STAT3 ($p < 0,0001$) (fig.13)
- **HSPA1A** con la de HSF1 (fig. 14)
- **IL6** con la de STAT3 ($p= 0,003$) (fig.14)

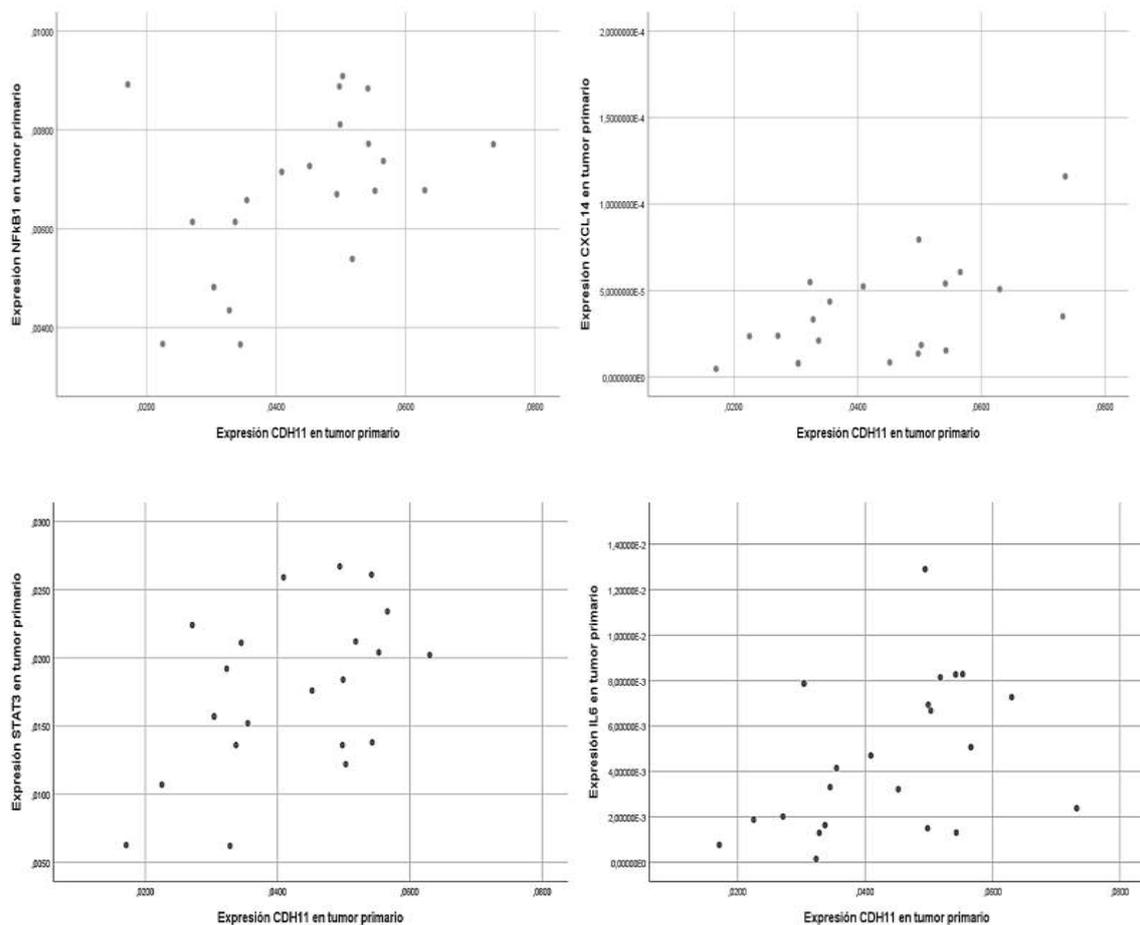


Figura 11. Correlaciones entre la expresión de CDH11 y NFKB1, CXCL14, IL6 y STAT3

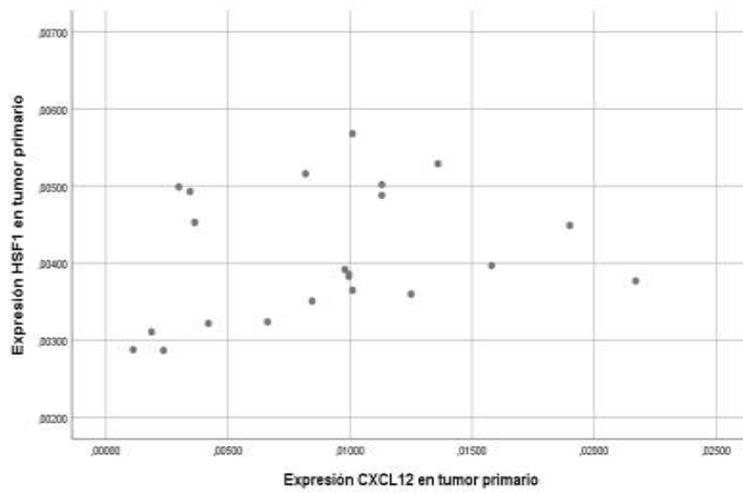


Figura 12. Correlación entre el aumento de CXCL12 y HSF1.

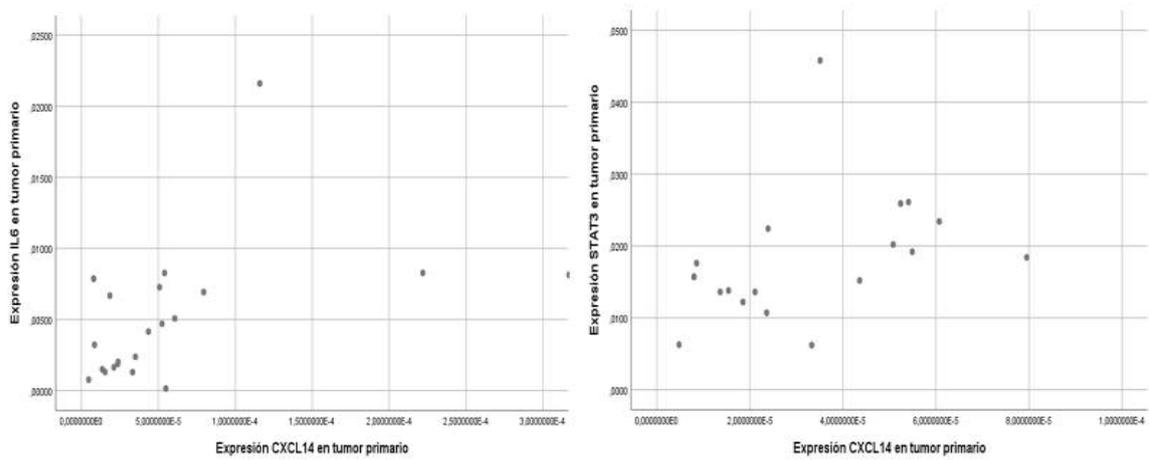


Figura 13. Correlación entre el aumento de expresión de CXCL14 con IL6 y STAT3.

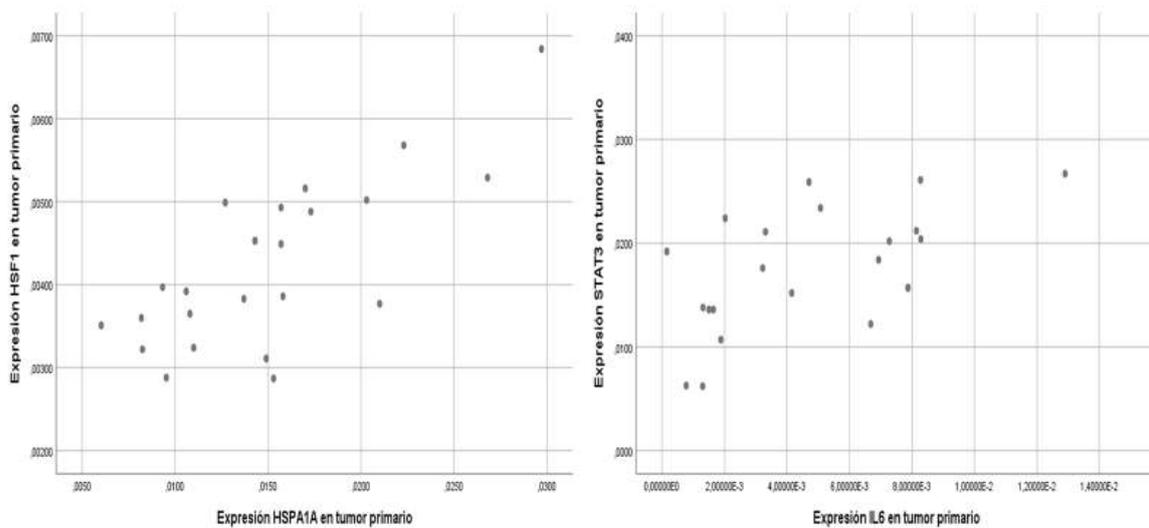


Figura 14. Correlaciones positivas entre HSPA1A con HSF1 e IL6 con STAT3.

Encontramos así mismo una correlación significativa pero inversa en la expresión de:

- **HSPA1** con la de FAP ($p= 0,027$) (fig.15)

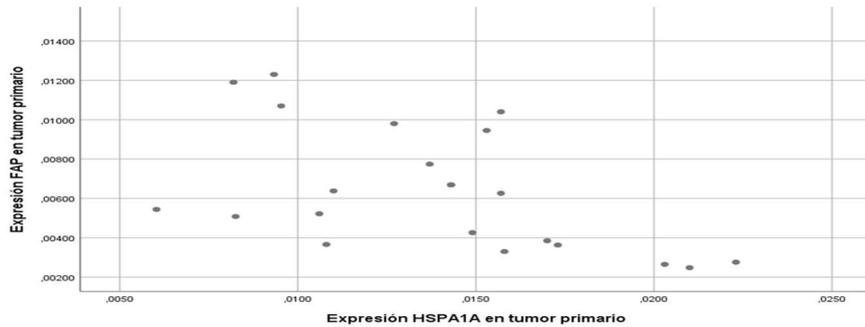


Figura 15. Correlación inversa entre la expresión HSPA1A y FAP.

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

En pacientes con CaP localizado se observó aumentada la expresión de IL6 ($p < 0,0001$), respecto al tejido prostático no tumoral (fig. 16). Por el contrario, disminuyó su expresión respecto al tejido normal de IL17RB ($p < 0,0001$) (fig. 17).

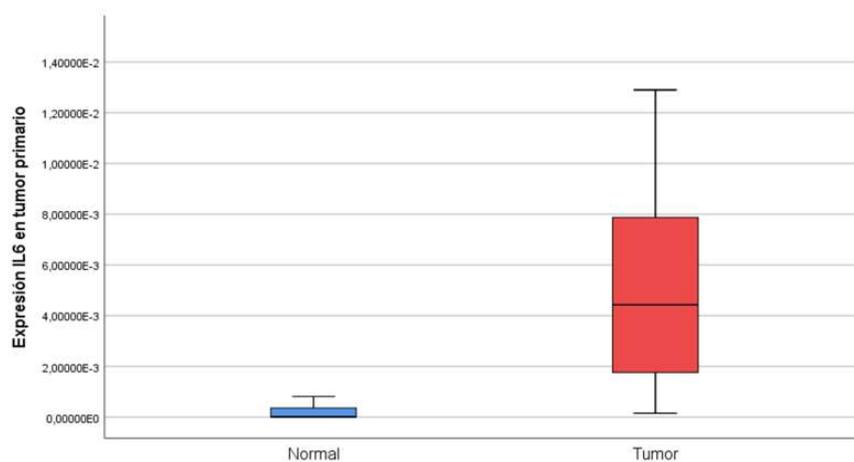


Figura 16. Aumento de expresión de IL6 en fibroblastos peritumorales.

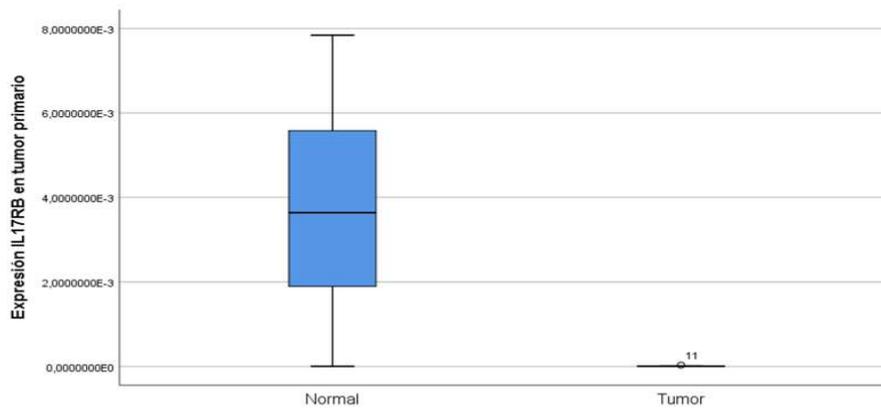


Figura 17. Disminución de la expresión de IL17RB en tumores primarios.

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

Dado el limitado número de pacientes en este grupo, no se analizaron los aspectos referentes a la asociación con los parámetros clínicos ni entre los propios marcadores.

Se estudió la relación de los factores entre los tejidos normal, tumor localizado y metastásico, con los siguientes resultados:

En pacientes con CaP metastásico fueron significativamente diferentes las mismas expresiones que en los tumores localizados, aumentando la de IL6 ($p=0,015$) y disminuyendo su expresión respecto al tejido normal la de IL17RB ($p=0,005$) (fig.18). No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos, lo cual implica, por un lado, que son capaces de diferenciar la presencia de una neoplasia respecto al tejido normal, pero no si el tumor está confinado en la glándula o es metastásico.

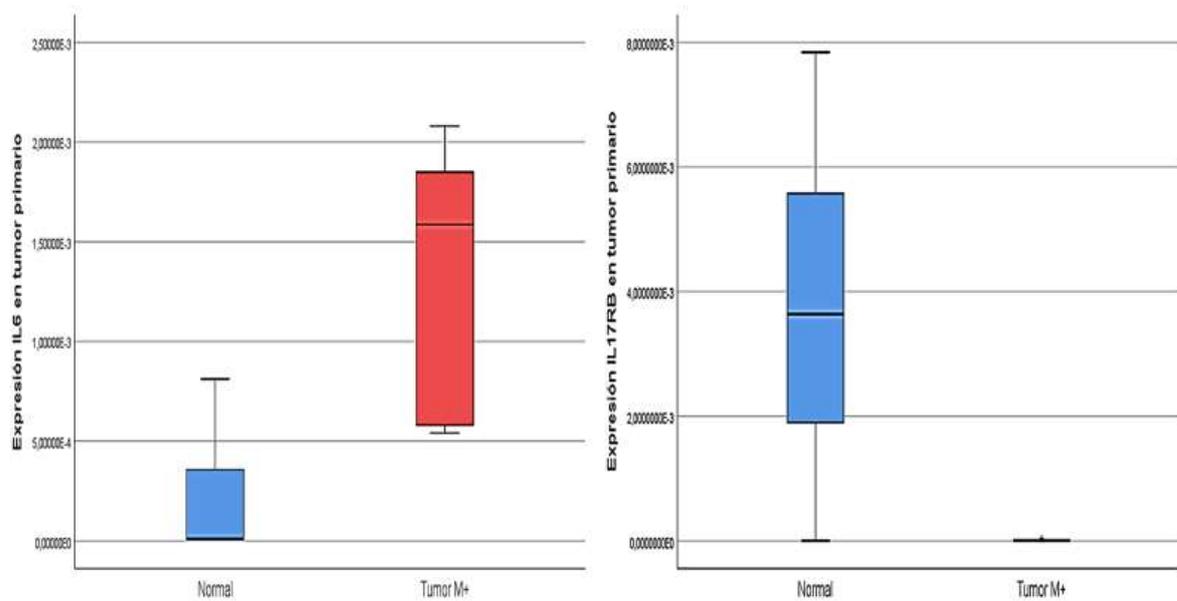


Figura 18. Expresión de IL6 e IL17RB, en tumores metastásicos. Al igual que describíamos en las figuras 15 y 16, referente a los tumores localizados, la expresión de IL6 aumenta y la IL17RB disminuye respecto los tejidos normales.

5.3 ANÁLISIS DE TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD EN LOS TUMORES LOCALIZADOS

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

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

El análisis de supervivencia (tiempo hasta la recidiva bioquímica) se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, comparando de forma univariable las curvas de supervivencia y evaluando así el efecto de cada uno de los factores moleculares sobre el tiempo hasta la

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

Se demostraron diferencias significativas en el tiempo hasta la recidiva bioquímica para CXCL12 ($p=0,006$), FAP ($p=0,045$) y NFkB1 ($p=0,015$), de manera que se demostró que una mayor expresión de CXCL12 y NFkB1 en los fibroblastos se asociaba estadísticamente con menor tiempo libre de enfermedad (fig.19) e, inversamente, para FAP, cuya mayor expresión se asociaba a mayor tiempo libre de enfermedad (fig.20).

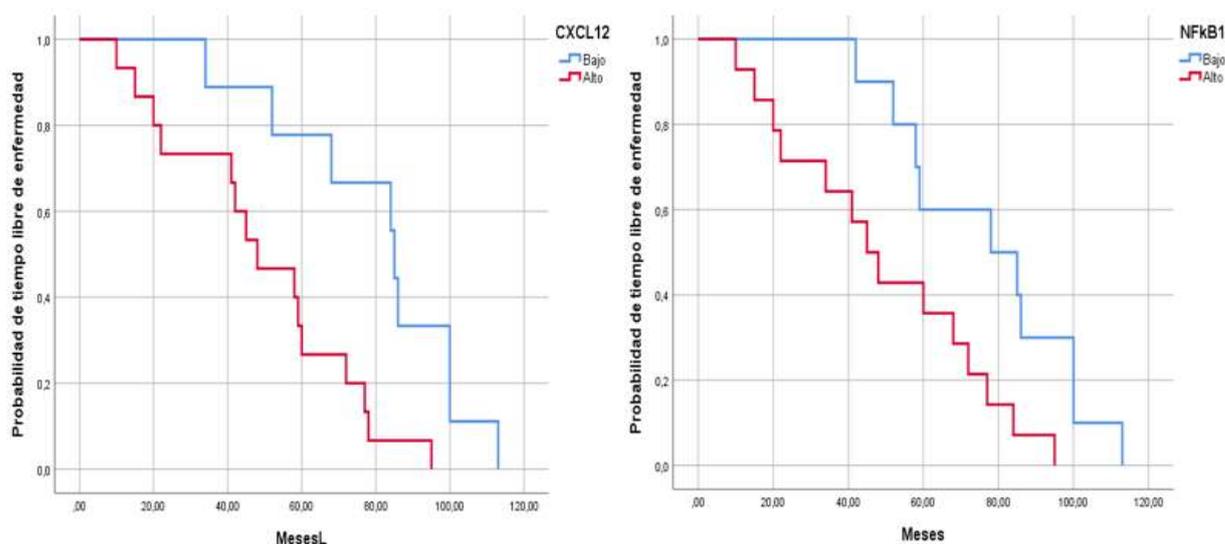


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad, en función de la expresión alta o bajo de CXCL12 y NFkB1.

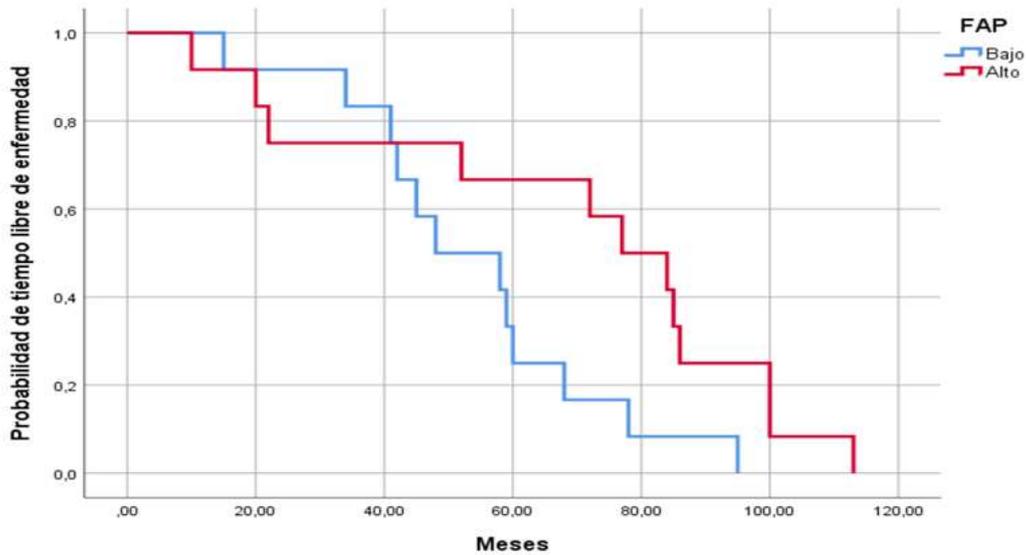


Figura 20. Curva de Kaplan-Meier que muestra que a mayor expresión de FAP mayor supervivencia libre de enfermedad.

En el análisis de regresión de Cox, CXCL12 en el estroma del tumor (en la biopsia) fue el único factor que resultó independiente para recidiva bioquímica ($p: 0,023$) (HR: 3,15; IC95%: 1,17-8,5) post prostatectomía, cuando se analizaron los parámetros clínicos como el estadio y grado de la biopsia, PSA previo y los factores estromales que habían resultado significativos en el estudio univariable (CXCL12, FAP y NFkB1). Cuando se realizó el estudio multivariable con los datos de la pieza de prostatectomía (estadio y grado patológicos, presencia de márgenes afectados) y los factores estromales significativos en el estudio univariable, (CXCL12, FAP y NFkB1) sólo resultaron factores independientes de recidiva la sobreexpresión de CXCL12 ($p: 0,038$; HR: 4,15; IC95%: 1,08-15,97) y de NFkB1 ($p: 0,049$; HR: 3,41; IC95%: 1,01-11,05) en el estroma del tumor.

6. Discusión

Actualmente, el manejo preciso del cáncer de próstata recién diagnosticado sigue siendo un reto por conseguir. La incapacidad de los parámetros clínicos-patológicos (niveles de PSA, estadio TNM y puntuación de Gleason) para distinguir con precisión los pocos cánceres agresivos de los muchos cánceres indolentes continúa siendo el centro del problema del sobretreatmento que implica la prostatectomía radical y la radioterapia en tumores con poco potencial maligno. Así mismo, el tratamiento de la enfermedad con una puntuación de Gleason de 7 sigue siendo un desafío, lo que hace imprescindible identificar los cambios moleculares que resultan de la enfermedad y que sirvan como biomarcadores para predecir con mayor precisión la agresividad y el resultado a largo plazo de la enfermedad (42). Desde hace varios años, el PSA sérico se ha utilizado con esa finalidad; sin embargo, debido a sus limitaciones inherentes, incluida la falta de especificidad, el cribado del PSA ha demostrado ser controvertido (cuatro de cada cinco ensayos clínicos aleatorizados recientes mostraron poca o ninguna mejoría en la mortalidad asociada con el tratamiento agresivo de enfermedades inherentemente benignas) (263), lo que ha llevado a una búsqueda intensiva de biomarcadores alternativos del cáncer de próstata con un mejor potencial diagnóstico y predictivo. En particular, existe una búsqueda de biomarcadores que puedan distinguir entre tumores agresivos e indolentes, lo que conduce a mejores decisiones de tratamiento.

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

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

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

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

Nuestro estudio se ha podido llevar a cabo gracias a la existencia de un equipo multidisciplinar con experiencia en trabajos de traslación clínica en CaP que ya han sido presentados en publicaciones internacionales en revistas de impacto. Destaca en el año 2017, los resultados publicados de diferentes factores estromales involucrados en el desarrollo, progresión y resistencia a la castración de CaP en muestras procedentes de tejido prostático recogidas por nuestro equipo (80).

Los 10 marcadores analizados en nuestro estudio incluyen proteínas implicadas en la interacción estroma/epitelio (**CDH11**, **FAP**, **CXCL12/SDF-1** y **CXCL14**), marcadores de inflamación de localización predominantemente estromal (**IL-6**, **IL-17 RB**, **STAT3** y

NFκβ1) y chaperonas (**Hsp72/HSPA1A** y **HSF-1**). Nuestros marcadores se evaluaron en los fibroblastos cultivados procedentes de tumores de próstata localizados, así como en los carcinomas metastásicos, tomando además muestras de tejido periférico al tumor (en pacientes con neoplasias localizadas) que se han considerado como tejido control normal, al no demostrarse en el estudio histopatológico de la biopsia la presencia de adenocarcinoma prostático en las zonas correspondientes.

La finalidad de este trabajo ha sido el estudio del comportamiento de los marcadores estromales de interacción estroma/epitelio y de inflamación con diferentes características clínico-patológicas tumorales. A continuación, discutiremos nuestros resultados comparándolos con la literatura existente, en aquellos marcadores cuya expresión pudiera tener cierta relevancia en la práctica clínica.

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

En cuanto a la **asociación** entre la expresión de **marcadores** y el **PSA** en nuestro estudio, no se encontró significación en dichas correlaciones en ninguno de los factores estudiados en los tumores localizados. En relación con el PSA mencionamos trabajos examinando este papel potencial de los marcadores donde vimos como por ejemplo como la Hsp72/HSPA1A plasmática no fue más eficaz que el PSA como predictor para el diagnóstico o estratificación de los pacientes en grupo de riesgo establecido (262). Otros estudios que buscan la relación entre el marcador clásico como es el PSA y algunos factores estromales como el NFκβ (264) y la IL-6 no observan una relación clara con los niveles de PSA (182). En contraste con estos resultados, Sasaki et al. (265) encontraron varios factores de crecimiento y citocinas derivados de CAF, como la IL-6 que aumentaron directamente la expresión de PSA en células LNCaP, lo que sugiere que los factores solubles derivados de fibroblastos pueden funcionar como factores activadores de RA en ausencia de andrógeno (265). La transcripción del gen *PSA* normalmente está regulada por andrógenos mediante la activación de la señalización de RA, además de los andrógenos, la expresión de PSA se induce mediante la activación de la señalización de RA por factores de crecimiento y citocinas derivados de CAF (266). Es importante destacar que la mayoría de las células fibroblásticas en el estroma prostático son negativas para RA (267) y los fenotipos de las células estromales fibroblásticas del CaP humano en este sentido son muy heterogéneas (268). Varios estudios han informado que las

interacciones sensibles e insensibles a los andrógenos entre las células estromales y epiteliales determinan cómo las células epiteliales de la próstata responden a la ablación de andrógenos (269)(270). En un entorno con bajo contenido de andrógenos, las interacciones estroma-epitelial pueden ser un mecanismo importante que controla la actividad de RA y la expresión de PSA regulada por RA (265). A partir de aquí, podríamos afirmar que la maquinaria molecular del estroma implicada en la carcinogénesis del CaP en la que intervienen estos factores, parece no depender directamente de andrógenos, lo cual es muy importante a la hora de buscar nuevas vías de desarrollo tumoral diferentes a las convencionales y que pudieran explicar en fases avanzadas la progresión tumoral y la conversión en CPRC.

6.2 Correlación entre los factores estromales y las características tumorales en la muestra de biopsia prostática

Al estudiar la relación de la expresión génica de los **factores** con el **estadio tumoral** encontramos una menor expresión de la quimiocina **CXCL14** a mayor estadio tumoral en los tumores localizados; en consonancia con diversos estudios donde la sobreexpresión de CXCL14 en las células tumorales presentaba efectos antitumorales y antiangiogénicos (271)(272), como ya comentamos previamente, además de disminuir la proliferación de las células tumorales y aumentar el reclutamiento de las células inmunes circundantes, es posible que también inhiba la neovascularización dentro de los tumores sólidos al bloquear la quimiotaxis de las células endoteliales (124). Sin embargo, otros trabajos indican actividad oncogénica 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 (113)(123). Nuestro grupo publicó en trabajos previos no haber encontrado una asociación significativa entre la expresión de CXCL14 por CAF en tumores localizados y la agresividad tumoral en el carcinoma de próstata (80). Aún son discutidos los efectos contradictorios, o al menos variables dependiendo del contexto de CXCL14 sobre la formación de tumores, no habiéndose aclarado los mecanismos moleculares específicos, así como el efecto de los niveles en la supresión de tumores.

En otros estudios sobre marcadores, la 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 (193), no encontrando dicha relación en nuestros resultados.

Encontramos también una disminución de la expresión de **CDH11** y de **IL-6** al aumentar el estadio tumoral en tumores localizados. Ya mencionamos como la **CDH11** en condiciones normales se expresa de forma muy débil en el estroma que rodea a los acinos secretores prostáticos no malignos. La expresión elevada de **CDH11** y la pérdida de función de la E-cadherina como en carcinomas epiteliales se asocia a progresión tumoral, mal pronóstico, conduciendo la progresión a un estado invasivo-metastásico (91). En los cánceres prostáticos, existe expresión de **CDH11** notablemente aumentada. Así, en los tumores de bajo grado la expresión se limitó a las células del estroma, mientras que, en los tumores de grado intermedio y alto, las células de carcinoma también la expresaron. La expresión inducida de **CDH11** en las células cancerosas se correlacionó significativamente con un aumento en el grado de Gleason. Además, en muchas de las lesiones metastásicas de CaP, se encontró sobreexpresión de **CDH11** (99). Se expresa a niveles altos en los osteoblastos, existiendo un papel potencial de la misma en la aparición de metástasis óseas. En varios estudios con modelos animales, la sobreexpresión de **CDH11** aumentaba la colonización de las células del CaP en el hueso (100). Estos datos entran en conflicto con nuestros resultados, en los que se objetivó que, a mayor grado de Gleason, se produce una disminución de la expresión de **CDH11**. Los resultados pueden ser diferentes por la población celular a estudio, en nuestro trabajo con fibroblastos, y en otros estudios en células epiteliales malignas, siendo necesario realizar investigaciones en cocultivos 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.

En cuanto a la **IL-6** sabemos que se produce en el estroma prostático si bien sus 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 (273), 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 (181). Las alteraciones en la señalización de la **IL-6**, pasando de

un inhibidor del crecimiento paracrino a un estimulador del crecimiento autocrino, así como su capacidad para activar RA en ausencia de andrógenos, juega un papel clave en la iniciación y progresión del CaP, metástasis y la resistencia a la castración y a la quimioterapia (173). Se describe que está involucrada en la biología del CaP, estando los niveles séricos elevados en pacientes con CaP metastásico o CPRC no tratado en comparación con pacientes sanos o pacientes con enfermedad localizada (174). Estudios han observado que esta citocina se asocia positivamente con los tumores que presentan un mayor grado Gleason (182). En nuestro estudio obtuvimos diferencias significativas encontrando que, a mayor grado, se produce una disminución de la expresión de **IL6**. Existe discrepancia entre resultados de diferentes grupos de investigación que pueden deberse a las variaciones en las concentraciones de **IL-6** y las condiciones de crecimiento de laboratorio.

6.3 Correlación entre la expresión de los diferentes factores

En este proyecto estudiamos la asociación entre los propios marcadores en los tumores localizados. Encontramos correlaciones directas entre la expresión de **CDH11** con las de **CXCL14**, **NFκβ1**, **IL-6** y **STAT3**. Relación significativa entre **CXCL12** con **HSF1**. El factor **CXCL14** con **IL6** y **STAT3**. **Hsp72/HSPA1A** con las de **FAP** y **HSF1**, y finalmente **IL6** con la de **STAT3**. Decir que, en todos, salvo en **Hsp72/HSPA1A** y **FAP** que fue una relación inversa, al aumentar una también lo hacía la expresión del otro marcador. Estudios muestran la asociación entre los marcadores; así, por ejemplo, observaciones de como la **CDH11** se encuentra aumentada su expresión, al igual que se encuentran concentraciones altas de **CXCL12** en tumores metastásicos. Vimos ya la relación de como cuando **IL-6** se une a su receptor, se produce la activación de **STAT3** que se transloca al núcleo e inicia la transcripción de genes. Uno de los papeles clave es la activación de **NFκβ1**, que a su vez regula la transcripción de proteínas inflamatorias. Así la inflamación crónica da como resultado una actividad elevada de **NFκβ1** y una liberación de citocinas como la **IL-6**, que por sí misma activa **STAT3** (201). Estudios ya han demostrado la asociación entre los niveles de **HSF1** y las proteínas de la familia de Hsp70 en líneas celulares de CaP agresivamente malignas (274). En nuestro estudio hemos dicho la relación inversa de **Hsp72/HSPA1A** y **FAP** en tumor localizado.

HSPA1A intracelular es necesario para el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas, protegiendo las células cancerosas del estrés oxidativo, hipoxia, citocinas inflamatorias y bloqueando las vías apoptóticas. Curiosamente, numerosos informes demuestran que los niveles basales de **HSPA1A**, tanto en suero como en el microambiente tumoral de pacientes con varios cánceres como en el CaP, a menudo se correlacionan con una mala supervivencia y respuesta a quimioterapia (80). La **FAP** es una proteína que se expresa significativamente en pacientes con CaP, y estudios previos han demostrado una expresión elevada de **FAP** en respuesta a TGF- β 1 como parte de la regulación estromal en PIN y el desarrollo de estroma reactivo durante la progresión del CaP (275).

Otro hallazgo destacable de nuestro trabajo es el incremento de expresión de **IL-6** cuando comparamos los la de los fibroblastos de tejido normal con la de los CAF en pacientes con CaP localizado (CPL), objetivando que la expresión de **IL-6** se encuentra elevada. Por el contrario, aparece una disminución de **IL-17RB** en los fibroblastos de CPL respecto al tejido normal. En cuanto a los factores relacionados con la inflamación, nuestros resultados muestran una elevación de **IL-6** en pacientes con CaP, lo cual está en consonancia con que la inflamación crónica mantenida pueda tener un papel en el CaP significativo (276). Con respecto **IL-17RB**, ya fue publicado por nuestro equipo, su expresión aparecía elevada en los CAF en pacientes con CaP, por lo que podría plantearse como un nuevo marcador de CaP en pacientes con biopsia de próstata negativa y sospecha de CaP (80). La **IL-17** es una de las citocinas que se encuentra elevado en muestras con inflamación linfocítica en el estroma del CaP que se correlaciona tanto con el estado del cáncer como con el grado de inflamación (165). 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.

6.4 Estudio de expresión de los marcadores en los tumores metastásicos

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

en este grupo. Se estudió la relación de los factores entre los tejidos normal, tumor localizado y metastásico.

En pacientes con CPM+ encontramos que existe una elevación génica de la **IL-6**, disminuyendo su expresión respecto al tejido normal la de **IL-17RB**. No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos, lo cual implica, por un lado, que son capaces de diferenciar la presencia de una neoplasia respecto al tejido normal, pero no si el tumor está confinado en la glándula o es metastásico. El hecho de que en nuestros resultados aparezca un patrón de factores que aumentan o disminuyen en el CaP, e incluso en todos los estadios de CaP, tanto en CPL como CPM+ , como la **IL-6** e **IL-17RB**, favorece la teoría de que en el estroma de la próstata se producen una serie de cambios, probables cambios en el estroma del tumor localizado o metastásico, cambios que podríamos decir que son compartidos respecto al tejido normal de la próstata, viendo claro como los fibroblastos del estroma tumoral reactivo difiere de los fibroblastos del tejido normal, siendo importante en ello la influencia probablemente por otros factores del estroma.

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

Una parte importante del estudio es que realizamos un análisis de tiempo libre de enfermedad en tumores localizados. Se demostraron diferencias significativas en el tiempo hasta la recidiva bioquímica tras prostatectomía radical para **CXCL12**, **FAP**, y **NFκβ1**, de manera que se demostró que una mayor expresión de **CXCL12** y **NFκB1** en los fibroblastos del tejido de tumoral de la biopsia ya se asociaba estadísticamente con menor tiempo libre de enfermedad y de forma inversa para **FAP**, cuya mayor expresión se asociaba a mayor tiempo libre de enfermedad.

Encontramos que **CXCL12** fue el único factor clínico que resultó un factor (incluyendo en el estudio multivariable el estadio y grado de la biopsia, además del resto de factores significativos en el estudio univariable) independiente de recidiva bioquímica en el estroma del tumor. Cuando se incluyeron los datos histológicos de la pieza de prostatectomía (estadio, grado y presencia de márgenes afectados) en lugar de los clínico-

patológicos de la biopsia, sólo resultaron factores independientes de recidiva la sobreexpresión de **CXCL12** y de **NFkβ1** en el estroma del tumor de la biopsia.

CXCL12 es secretado por las células estromales, activando su receptor **CXCR4** en las células tumorales induciendo vías carcinogénicas e incrementando la angiogénesis. Demostrado es su papel en la progresión de tumores malignos y dicho ya como sus altos niveles inducen un fenotipo más agresivo en las células de CaP (130). Y visto ya su papel fundamental en las metástasis óseas(131). Se podría ver el factor **CXCL12** como un factor pronóstico de supervivencia, así que fenotipos menos agresivos se relacionarían con mayor tiempo de supervivencia libre de recurrencia bioquímica. En nuestro estudio una mayor expresión de **CXCL12**, en concordancia con otros estudios en los que su expresión elevada da fenotipos más agresivos, se asocia con menor tiempo libre de enfermedad. En cuanto su utilidad con diana terapéutica, las observaciones actuales sugieren que los antagonistas de la vía **CXCL12-CXCR4** pueden ser agentes potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata (277).

NFkβ1 juega un importante papel en la proliferación y diferenciación celular. Además, participa en la regulación de la supervivencia y la apoptosis (278). Muchos estudios han descrito la activación constitutiva de **NFkβ1** en diversos tumores como en el CaP. La sobreexpresión de éste en el núcleo de las células prostáticas se ha relacionado con tumores de fenotipo más agresivos, metástasis (208) y quimiorresistencia (207). Investigaciones en cuanto a la recidiva bioquímica observan que el PSA, el Gleason y el **NFkβ1** nuclear fueron predictores independientes de recidiva bioquímica, indicando que la que la localización nuclear de **NFkβ1** es un factor pronóstico que predice de forma independiente un alto riesgo de dicha recidiva en el CaP. Otras investigaciones en pacientes con CaP señalan que los márgenes quirúrgicos positivos en las muestras de prostatectomía, la localización nuclear de **NFkβ1** se asoció con un alto riesgo de recidiva bioquímica viendo también que la mayoría de las metástasis en los ganglios linfáticos del CaP tenían una tinción nuclear evidente con **NFkβ1**. Algunos estudios encuentran diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre bioquímica en función de la expresión de **NFkβ1** sugiriendo la potencial relevancia biológica de este marcador(207). Estos datos son congruentes con nuestro estudio, en el que una mayor expresión de **NFkβ1** conlleva un menor tiempo libre de supervivencia.

FAP es una glicoproteína que está sobreexpresada 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 de factor pronóstico y de diana terapéutica (162). Estudios intentan estratificar el aumento de **FAP** en función del tipo de enfermedad, encontrando que la expresión de **FAP** fue similar en los tumores prostáticos independientemente del grado de Gleason (153). En nuestro estudio lo que se encontró fue que una mayor expresión de **FAP** se asociaba a mayor tiempo libre de enfermedad, por lo que se necesitan más estudios para aclarar su significado. En la actualidad múltiples estudios, trabajan sobre su potencial como objetivo terapéutico tumoral (151).

Así, la sobreexpresión estromal de **CXCL12** y de **NFκβ1**, resultaron los únicos factores predictores de recidiva bioquímica, siendo importantes como factores predictores de tiempo hasta la recidiva incluso solo con parámetros de la biopsia antes de la prostatectomía, si bien el número de casos es escaso y los índices de confianza amplios por este escaso número de casos. Sin embargo, es un dato para tener en cuenta y merece un estudio más amplio para conocer posibles factores patológicos de recidiva bioquímica y de este modo tener nuevas herramientas más precisas para etiquetar aquellos pacientes de alto riesgo y su tratamiento más adecuado ya que en el momento actual la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata que desarrollarán enfermedad metastásica debutan con una enfermedad localizada de alto riesgo (279). Los enfoques de tratamiento varían dentro de este grupo de hombres de alto riesgo y el tratamiento inicial óptimo para estos pacientes aún no está claro y es ampliamente debatido. Los cánceres de próstata avanzados local y regionalmente representan una población heterogénea de tumores con riesgos variables de recidiva bioquímica y desarrollo metastásico después del tratamiento (280). Aunque la monoterapia sola puede controlar adecuadamente un subconjunto de estos cánceres, las guías de práctica clínica generalmente apoyan los enfoques de **tratamiento multimodal**, que incluyen prostatectomía radical (PR) seguida de radioterapia adyuvante (RT) o RT primaria con terapia adyuvante de privación de andrógenos (TDA) así como quimioterapia neoadyuvante y/o adyuvante, terapia hormonal o terapia combinada quimio-hormonal. Sin embargo, el beneficio de la quimioterapia o la terapia quimio-hormonal aún no se ha demostrado fuera del entorno metastásico (281). Además, no se ha demostrado el beneficio de las terapias sistémicas neoadyuvantes y / o adyuvantes en combinación con la prostatectomía radical (279), lo

que enfatiza la importancia de una mayor precisión de clasificación de estos enfermos para mejores enfoques terapéuticos; en este sentido nuestros resultados en la expresión de **CXCL12** y de **NFκβ1** resultan prometedores y objeto de nuevos estudios.

Con todo, parece que el estroma tumoral alberga procesos profundos en la progresión tumoral demostrando los resultados la heterogeneidad de los CAF en el CaP. Su atractivo radica por su genoma más estable que el de las células epiteliales y el estar presente en el seno del propio carcinoma de los pacientes. El empleo en cultivos favorece la identificación de biomarcadores más fiables en el CaP, y destacar el papel prometedor del estroma en la carcinogénesis y una opción atractiva para futuras estrategias de tratamiento.

Se espera que la terapia dirigida al compartimento estromal sea clínicamente prometedora, y un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a las interacciones entre el tumor y el estroma puede producir nuevas dianas terapéuticas para el cáncer de próstata. En definitiva, se requieren más estudios para comprender completamente las complejas interacciones entre las células cancerosas y el microambiente tumoral, siendo el papel de los factores estromales cada vez más destacado en las estrategias futuras para abordar la enfermedad.

6.6 Limitaciones

La principal limitación de nuestro trabajo es el pequeño tamaño muestral debido especialmente a la compleja metodología para el procesamiento del tejido obtenido durante el cultivo celular. De todos modos, consideramos que el número de casos es suficiente para obtener datos fiables para verificar los objetivos establecidos. En una fase inicial se ha optimizado el cultivo de estas células, proceso muy delicado por la facilidad de la contaminación del material obtenido por biopsia transrectal con la flora intestinal común, lo cual requiere una serie de pasos y procesos complejos que se han conseguido llevar a cabo.

Por otro lado, dada la complejidad para obtener tejido tumoral prostático de la pieza de PR para cultivo, durante la fase de recogida de las muestras, realizamos biopsias de próstata transrectales sistemáticas. Para asegurar la obtención de tejido, se recogieron muestras pareadas durante la biopsia previa (figura 6, página 63) existiendo la posibilidad

de que en la muestra para nuestro estudio no se presentase un carcinoma y sí en la usada para diagnóstico. Esta dificultad junto con la contaminación de la muestra, pueden minimizarse mediante las biopsias transperineales dirigidas por fusión de imágenes, ya que son mucho más precisas en la zona a biopsiar en los focos tumorales y las zonas normales, y no ser a través del recto la contaminación bacteriana es mucho menor.

Aunque en los pacientes con tumores localizados se utilizó la suma de Gleason de la pieza de PR, en los pocos casos de tumores metastásicos empleamos la suma de Gleason de la biopsia prostática pudiendo no haber concordancia con la del tumor, por lo que serían resultados menos precisos.

7. Conclusiones

1-Expresión de los marcadores estromales de interacción estroma epitelio y de inflamación:

- No se demostró una correlación estadística entre el nivel de **PSA** y la expresión de ninguno de los marcadores de estudio.
- A mayor estadio tumoral se demostró una menor expresión de **CXCL14**.
- Una suma de Gleason más alta en la pieza de prostatectomía radical se asoció significativamente con una disminución de las expresiones de **CDH11** e **IL6**.

2-Correlaciones entre la expresión de marcadores estromales en tumores localizados:

Fueron significativas las correlaciones entre las expresiones de los siguientes factores:

- **CDH11** con las de **CXCL14**, **NFkB1**, **IL6**, **STAT3**
- **CXCL12** con la de **HSF1**
- **CXCL14** con las de **IL6** y **STAT3**
- **HSPA1A** con las de **FAP** y **HSF1**
- **IL6** con la de **STAT3**

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

- La expresión de **IL6** aumentó respecto al tejido prostático no tumoral. Por el contrario, disminuyó la expresión respecto al tejido normal de **IL17RB**.
- En pacientes con tumores metastásicos, se encontraron aumentadas las mismas expresiones que en los tumores localizados, es decir la de **IL6**, y disminuyó igualmente su expresión respecto al tejido normal la de **IL17RB**.

- No se encontraron diferencias en las expresiones de ninguno de los marcadores analizados al comparar los tumores localizados con los metastásicos.

4-En el análisis de supervivencia, la sobreexpresión estromal de **CXCL12** y **NFκB1**, así como una menor expresión de **FAP** resultaron en el estudio univariable ser factores clínicos predictores de recidiva bioquímica. En el análisis de regresión de Cox, sólo la sobreexpresión estromal de **CXCL12** en el tejido de la biopsia de próstata resultó un factor predictor de recidiva bioquímica.

5-En el estudio multivariable incluyendo los parámetros patológicos de la pieza de prostatectomía radical, solo la sobreexpresión estromal de **CXCL12** y de **NFκB1** en el tejido de la biopsia de próstata, resultaron los únicos factores predictores de recidiva bioquímica.

*8. Significado
de nuestros resultados*

Seguimos ante la incertidumbre de no poder clasificar con precisión algunos de nuestros pacientes con CaP para ofertarles el tratamiento más individualizado posible. Ante un screening masivo acabaremos diagnosticando y sobretratando pacientes con tumores de bajo riesgo que, o bien no iban a dar problemas, o de darlos, su tratamiento y posteriores secuelas se retrasarían a 10 años o incluso más. Por el contrario, de no hacerlo, muchos tumores agresivos pueden hacer disminuir la supervivencia de estos enfermos.

Investigamos la forma de poder diagnosticar tumores de próstata de la forma menos invasiva posible, ayudándonos de todas las pruebas que retrasen o eviten la biopsia. Una vez que tenemos la biopsia, junto con las características clínicas del paciente (PSA, tacto), sabremos en muchos casos las mejores opciones terapéuticas; sin embargo, en tumores de alto riesgo o riesgo intermedio (ISUP 3, Gleason 4+3), seguimos necesitando nuevos parámetros para así decidir, por ejemplo, a qué paciente no merece la pena someterlo a una prostatectomía radical dado su mal pronóstico, o por el contrario, cuál se beneficiará de un adyuvancia quimiohormonal previa; las opciones son múltiples y desgraciadamente aún existen dudas sobre qué terapias serán las más acertadas en cada caso.

De este trabajo destacamos el estudio del estroma prostático como fuente de marcadores que sirvan para ayudar al diagnóstico, para el pronóstico incluso como dianas terapéuticas. Nos centramos en cultivos celulares de fibroblastos del estroma prostático por sufrir importantes cambios durante la carcinogénesis y por ser una destacada fuente de expresión de los marcadores estudiados.

A **destacar** entre los resultados obtenidos en el estudio:

- El hecho de que muchos tumores sobreexpresan marcadores estromales sin que se relacione con elevaciones del PSA, nos lleva a pensar que la maquinaria molecular del estroma implicada en la carcinogénesis parece no depender directamente de andrógenos, lo cual es muy importante a la hora de buscar nuevas vías de desarrollo tumoral diferentes a las convencionales y que pudieran explicar en fases avanzadas la progresión tumoral y la conversión en CPRC
- La sobreexpresión de **CXCL12** y de **NFκβ1**, resultaron predictores de recidiva bioquímica, al incluir los datos de la prostatectomía radical
- **Lo más importante del estudio: la sobreexpresión de CXCL12 ya predice un mal pronóstico desde el momento de la biopsia.** Es necesario hacer estudios con mayor número de casos, pero en esencia es lo que la uro-oncología busca, un marcador que haga diferente dos tumores iguales y, por tanto, que nos planteemos dos tratamientos distintos ante casos que hoy en día son iguales.

- **CXCL12** también se postula como diana terapéutica, ya que existe un antagonista de su receptor, que inhibe el crecimiento tumoral y las metástasis en modelos animales y está siendo estudiada en la actualidad su seguridad en pacientes.

Para que los “clínicos” podamos avanzar y ofrecer mejoras en la calidad asistencial a los pacientes, es **esencial** la **investigación** con nuevos estudios, con más casos, que aporten más certeza a los conocimientos actuales.

9. Bibliografía

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* [Internet]. 2019 Dec 1;9(4):217–22. Available from: [/pmc/articles/PMC7310786/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3210786/)
2. Roberts MJ, Teloken P, Chambers SK, Williams SG, Yaxley J, Samaratunga H, et al. Prostate Cancer Detection [Internet]. Endotext. MDText.com, Inc.; 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905271>
3. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jul 19;367(3):203–13. Available from: [/pmc/articles/PMC3429335/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/223429335/)
4. Loriot Y, Massard C, Fizazi K. Recent developments in treatments targeting castration-resistant prostate cancer bone metastases [Internet]. Vol. 23, *Annals of Oncology*. Elsevier; 2012. p. 1085–94. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S092375341934709X/fulltext>
5. Harvey CJ, Pilcher J, Richenberg J, Patel U, Frauscher F. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *Br J Radiol* [Internet]. 2012 Nov 1;85(SPEC. ISSUE 1):S3. Available from: [/pmc/articles/PMC3746408/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23746408/)
6. Baade PD, Youlten DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: Geographical distribution and secular trends [Internet]. Vol. 53, *Molecular Nutrition and Food Research*. Mol Nutr Food Res; 2009. p. 171–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19101947/>
7. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: Importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2009 Mar 18;101(6):374–83. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/101/6/374/995411>
8. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: International comparisons. *BJU Int* [Internet]. 2002;90(2):162–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12081758/>
9. 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* [Internet]. 2007 Mar 1;18(3):581–92. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419378482/fulltext>
10. Galceran J, Amejjide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2014;13. Available from: <http://redcan.org/es/index.cfm>
11. Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Szabo A, Falcon S, Wegelin J, et al. Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2008 Mar 20;19(2):175–81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10552-007-9083-8>
12. Berg CD, Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* [Internet].

- 2009 Mar 26;360(13):1310–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297565/>
13. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized european study. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Mar 26;360(13):1320–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297566/>
 14. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, et al. Prevention and early detection of prostate cancer [Internet]. Vol. 15, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2014. p. e484–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25281467/>
 15. Orom H, Underwood W, Homish DL, Kiviniemi MT, Homish GG, Nelson CJ, et al. Prostate cancer survivors’ beliefs about screening and treatment decision-making experiences in an era of controversy. *Psychooncology* [Internet]. 2015 Sep 1;24(9):1073–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25382436/>
 16. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers [Internet]. Vol. 39, *Cellular Oncology*. Springer Netherlands; 2016. p. 97–106. Available from: </pmc/articles/PMC4821699/?report=abstract>
 17. Yanai Y, Kosaka T, Hongo H, Matsumoto K, Shinojima T, Kikuchi E, et al. Evaluation of prostate-specific antigen density in the diagnosis of prostate cancer combined with magnetic resonance imaging before biopsy in men aged 70 years and older with elevated PSA. *Mol Clin Oncol* [Internet]. 2018 Sep 19;9(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30546897/>
 18. King MT, Nguyen PL, Boldbaatar N, Yang DD, Muralidhar V, Tempany CM, et al. Evaluating the influence of prostate-specific antigen kinetics on metastasis in men with PSA recurrence after partial gland therapy. *Brachytherapy* [Internet]. 2019 Mar 1;18(2):198–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638910/>
 19. Narayan VM. A critical appraisal of biomarkers in prostate cancer. *World J Urol* [Internet]. 2020 Mar 1;38(3):547–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30993424/>
 20. Olleik G, Kassouf W, Aprikian A, Hu J, Vanhuyse M, Cury F, et al. Evaluation of new tests and interventions for prostate cancer management: A systematic review [Internet]. Vol. 16, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Harborside Press; 2018. p. 1340–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30442734/>
 21. Voigt JD, Dong Y, Linder V, Zappala S. Use of the 4Kscore test to predict the risk of aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy: Overall cost savings and improved quality of care to the us healthcare system. *Rev Urol* [Internet]. 2017;19(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522924>
 22. Loeb S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer. In: *Urology Practice* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017. p. 315–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29104903/>
 23. Raja N, Russell CM, George AK. Urinary markers aiding in the detection and risk

- stratification of prostate cancer [Internet]. Vol. 7, Translational Andrology and Urology. AME Publishing Company; 2018. p. S436–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30363496/>
24. Kohaar I, Petrovics G, Srivastava S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges [Internet]. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31013716/>
 25. Verma S, Choyke PL, Eberhardt SC, Oto A, Tempany CM, Turkbey B, et al. The current state of MR imaging-targeted biopsy techniques for detection of prostate cancer [Internet]. Vol. 285, Radiology. Radiological Society of North America Inc.; 2017. p. 343–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29045233/>
 26. Brizmohun Appayya M, Adshead J, Ahmed HU, Allen C, Bainbridge A, Barrett T, et al. National implementation of multi-parametric magnetic resonance imaging for prostate cancer detection – recommendations from a UK consensus meeting [Internet]. Vol. 122, BJU International. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 13–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29699001/>
 27. Litjens GJS, Barentsz JO, Karssemeijer N, Huisman HJ. Clinical evaluation of a computer-aided diagnosis system for determining cancer aggressiveness in prostate MRI. *Eur Radiol* [Internet]. 2015 Nov 1;25(11):3187–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26060063/>
 28. Barentsz JO, Weinreb JC, Verma S, Thoeny HC, Tempany CM, Shtern F, et al. Synopsis of the PI-RADS v2 Guidelines for Multiparametric Prostate Magnetic Resonance Imaging and Recommendations for Use [Internet]. Vol. 69, European Urology. Elsevier B.V.; 2016. p. 41–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6364687/>
 29. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-targeted or standard biopsy for prostate-cancer diagnosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 May 10;378(19):1767–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29552975/>
 30. Pagniez MA, Kasivisvanathan V, Puech P, Drumez E, Villers A, Olivier J. Predictive Factors of Missed Clinically Significant Prostate Cancers in Men with Negative Magnetic Resonance Imaging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Urol* [Internet]. 2020 Jul 1;204(1):24–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967522/>
 31. Hofman MS, Murphy DG, Williams SG, Nzenza T, Herschtal A, De Abreu Lourenco R, et al. A prospective randomized multicentre study of the impact of gallium-68 prostate-specific membrane antigen (PSMA) PET/CT imaging for staging high-risk prostate cancer prior to curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA study): clinical trial protocol. *BJU Int* [Internet]. 2018 Nov 1;122(5):783–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29726071/>
 32. Anton A, Kamel Hasan O, Ballok Z, Bowden P, Costello AJ, Harewood L, et al. Use of prostate-specific membrane antigen positron-emission tomography/CT in response assessment following upfront chemohormonal therapy in metastatic prostate cancer [Internet]. BJU International. Blackwell Publishing Ltd; 2020.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32579772/>

33. Srigley JR, Delahunt B, Egevad L, Samaratunga H, Yaxley J, Evans AJ. One is the new six: The International Society of Urological Pathology (ISUP) patient-focused approach to Gleason grading [Internet]. Vol. 10, Canadian Urological Association Journal. Canadian Urological Association; 2016. p. 339–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5085914/>
34. D’Amico A V., Whittington R, Bruce Malkowicz S, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1998 Sep 16;280(11):969–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9749478/>
35. 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 Heal drug benefits* [Internet]. 2014 May;7(3):129–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991397>
36. Pinsky PF, Crawford ED, Kramer BS, Andriole GL, Gelmann EP, Grubb R, et al. Repeat prostate biopsy in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial. *BJU Int* [Internet]. 2007 Apr 1;99(4):775–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2007.06708.x>
37. Stewart GD, Van Neste L, Delvenne P, Delrée P, Delga A, McNeill SA, et al. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: Results of the MATLOC study. *J Urol* [Internet]. 2013 Mar;189(3):1110–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22999998/>
38. Edwards DR, Moroz K, Zhang H, Mulholland D, Abdel-Mageed AB, Mondal D. PRL-3 increases the aggressive phenotype of prostate cancer cells in vitro and its expression correlates with high-grade prostate tumors in patients. *Int J Oncol* [Internet]. 2018 Feb 1;52(2):402–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29207031/>
39. Romero-Otero J, García-Gómez B, Duarte-Ojeda JM, Rodríguez-Antolín A, Vilaseca A, Carlsson S V., et al. Active surveillance for prostate cancer [Internet]. Vol. 23, International Journal of Urology. Blackwell Publishing; 2016. p. 211–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26621054/>
40. Olleik G, Kassouf W, Aprikian A, Hu J, Vanhuysse M, Cury F, et al. Evaluation of new tests and interventions for prostate cancer management: A systematic review [Internet]. Vol. 16, JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network. Harborside Press; 2018. p. 1340–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30442734/>
41. Eggener S, Karsh LI, Richardson T, Shindel AW, Lu R, Rosenberg S, et al. A 17-gene Panel for Prediction of Adverse Prostate Cancer Pathologic Features: Prospective Clinical Validation and Utility. *Urology* [Internet]. 2019 Apr 1;126:76–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30611659/>
42. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer [Internet]. Vol. 32, Genes and Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press;

2018. p. 1105–40. Available from: [/pmc/articles/PMC6120714/?report=abstract](#)
43. Litwin MS, Tan HJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review [Internet]. Vol. 317, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2017. p. 2532–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655021/>
 44. Gandaglia G, Martini A, Ploussard G, Fossati N, Stabile A, De Visschere P, et al. External Validation of the 2019 Briganti Nomogram for the Identification of Prostate Cancer Patients Who Should Be Considered for an Extended Pelvic Lymph Node Dissection. *Eur Urol* [Internet]. 2020 Aug 1;78(2):138–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32268944/>
 45. Cimino S, Reale G, Castelli T, Favilla V, Giardina R, Russo GI, et al. Comparison between Briganti, Partin and MSKCC tools in predicting positive lymph nodes in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 51, *Scandinavian Journal of Urology*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 345–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21681805.2017.1332680>
 46. Rodriguez-Covarrubias F, Sotomayor-de-Zavaleta M, Castillejos-Molina R, Gabilondo-Navarro F, Feria-Bernal G. [Comparison between surveillance, adjuvant radiotherapy, or salvage radiotherapy after radical prostatectomy in patients with prostate cancer (PCa) in stage pT3 or higher and/or positive surgical margins]. *Gac Med Mex* [Internet]. 2014;150 Suppl:140–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25643773/>
 47. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics* [Internet]. 2013 Oct 8;14(1):690. Available from: [/pmc/articles/PMC4007703/?report=abstract](#)
 48. Blume-Jensen P, Berman DM, Rimm DL, Shipitsin M, Putzi M, Nifong TP, et al. Biology of Human Tumors Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Jun 1;21(11):2591–600. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
 49. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Apr 10;31(11):1428–34. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.46.4396>
 50. Freedland SJ, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, et al. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2013 Aug 1;86(5):848–53. Available from: [/pmc/articles/PMC3710548/?report=abstract](#)
 51. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 May 17;19(5):575–86. Available from: [/pmc/articles/PMC3142785/?report=abstract](#)

52. Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, Koumakpayi IH, Katz RL, Khanna A, et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* [Internet]. 2009 Aug 1;218(4):505–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.2559>
53. Boström PJ, Bjartell AS, Catto JWF, Eggener SE, Lilja H, Loeb S, et al. Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. Vol. 68, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2015. p. 1033–44.
54. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression [Internet]. Vol. 19, *Endocrine-Related Cancer*. NIH Public Access; 2012. p. R187. Available from: </pmc/articles/PMC3716392/?report=abstract>
55. Costa-Almeida R, Soares R, Granja PL. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2018 Jan 1;12(1):240–51. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.2405>
56. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [Internet]. Vol. 200, *Journal of Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2003. p. 500–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1427>
57. Rowley DR. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? [Internet]. Vol. 17, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer Netherlands; 1998. p. 411–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006129420005>
58. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast [Internet]. Vol. 13, *Wound Repair and Regeneration*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005. p. 7–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x>
59. Tanner MJ, Welliver RC, Chen M, Shtutman M, Godoy A, Smith G, et al. Effects of androgen receptor and androgen on gene expression in prostate stromal fibroblasts and paracrine signaling to prostate cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(1):16027. Available from: </pmc/articles/PMC3022749/?report=abstract>
60. Gerdes MJ, Larsen M, Dang TD, Ressler SJ, Tuxhorn JA, Rowley DR. Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-β1. *Prostate* [Internet]. 2004 Feb 15;58(3):299–307. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.10327>
61. Yu S, Yeh CR, Niu Y, Chang HC, Tsai YC, Moses HL, et al. Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts. *Prostate* [Internet]. 2012 Mar;72(4):437–49. Available from: </pmc/articles/PMC4402036/?report=abstract>
62. Yanagisawa N, Li R, Rowley D, Liu H, Kadmon D, Miles BJ, et al. Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol*. 2007 Nov 1;38(11):1611–20.
63. Ibrahim SN, Lightner VA, Ventimiglia JB, Ibrahim GK, Walther PJ, Bigner DD, et al. Tenascin expression in prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and

- carcinoma. *Hum Pathol*. 1993 Sep 1;24(9):982–9.
64. Xue Y, Smedts F, Latijnhouwers MA, Ruijter ET, Aalders TW, De La Rosette JJMCH, et al. Tenascin-C expression in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): A marker of progression? *Anticancer Res* [Internet]. 1998 Jul 1;18(4 A):2679–84. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9703928>
 65. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, et al. Reactive Stroma as a Predictor of Biochemical-Free Recurrence in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13).
 66. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. Vol. 166, *Journal of Urology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 2472–83.
 67. Orr B, Riddick ACP, Stewart GD, Anderson RA, Franco OE, Hayward SW, et al. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene* [Internet]. 2012 Mar 1;31(9):1130–42. Available from: </pmc/articles/PMC3307063/?report=abstract>
 68. Tomas D, Ulamec M, Hudolin T, Bulimbašić S, Belicza M, Krušlin B. Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin-C and laminin in prostate adenocarcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2006 Dec 2;9(4):414–9. Available from: www.nature.com/pcan
 69. Bonollo F, Thalmann GN, Julio MK De, Karkampouna S. The role of cancer-associated fibroblasts in prostate cancer tumorigenesis [Internet]. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020. p. 1–28. Available from: </pmc/articles/PMC7409163/?report=abstract>
 70. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal Cells Promote Angiogenesis and Growth of Human Prostate Tumors in a Differential Reactive Stroma (DRS) Xenograft Model. *Cancer Res*. 2002;62(11).
 71. Thalmann GN, Rhee H, Sikes RA, Pathak S, Multani A, Zhou HE, et al. Human Prostate Fibroblasts Induce Growth and Confer Castration Resistance and Metastatic Potential in LNCaP Cells. *Eur Urol* [Internet]. 2010 Jul;58(1):162–72. Available from: </pmc/articles/PMC2889152/?report=abstract>
 72. Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH. Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *Am J Pathol* [Internet]. 2010;177(1):21–8. Available from: </pmc/articles/PMC2893647/?report=abstract>
 73. Grompe M. The Role of Bone Marrow Stem Cells in Liver Regeneration [Internet]. Vol. 23, *Seminars in Liver Disease*. Copyright © 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: +1(212) 584-4662 ; 2003. p. 363–71. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2004-815560>
 74. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression [Internet]. Vol. 432, *Nature*. Nature Publishing Group; 2004. p. 332–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature03096>
 75. Choi SYC, Lin D, Gout PW, Collins CC, Xu Y, Wang Y. Lessons from patient-

- derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. Vol. 79, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2014. p. 222–37.
76. Taylor RA, Risbridger GP. Prostatic tumor stroma: A key player in cancer progression. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2008;8(6):490–7. Available from: <https://research.monash.edu/en/publications/prostatic-tumor-stroma-a-key-player-in-cancer-progression>
 77. Krušlin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: An important factor in cancer growth and progression [Internet]. Vol. 15, *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. Association of Basic Medical Sciences Federation of Bosnia and Herzegovina; 2015. p. 1. Available from: </pmc/articles/PMC4469930/?report=abstract>
 78. Olumi A, Grossfeld G, Hayward S, Carroll P, Cunha G, Hein P, et al. Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2000 Mar 12;2(S1):S.19. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr138>
 79. 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* [Internet]. 2007 May 1;67(9):4244–53. Available from: www.aacrjournals.org
 80. Eiro N, Fernandez-Gomez J, Sacristán R, Fernandez-Garcia B, Lobo B, Gonzalez-Suarez J, et al. Stromal factors involved in human prostate cancer development, progression and castration resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 Feb 1;143(2):351–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27787597/>
 81. Clark AK, Taubenberger A V., Taylor RA, Niranjana B, Chea ZY, Zotenko E, et al. A bioengineered microenvironment to quantitatively measure the tumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in human prostate cancer. *Biomaterials*. 2013 Jul 1;34(20):4777–85.
 82. Dvořánková BB, Lacina L, Smetana K. Isolation of normal fibroblasts and their cancer-associated counterparts (CAFs) for biomedical research. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2019. p. 393–406. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651_2018_137
 83. Shariat SF, Scherr DS, Gupta A, Bianco FJ, Karakiewicz PI, Zeltser IS, et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis [Internet]. Vol. 64, *Archivos Espanoles de Urologia*. Arch Esp Urol; 2011. p. 681–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22052751/>
 84. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis [Internet]. Vol. 9, *Nature Reviews Cancer*. NIH Public Access; 2009. p. 239–52. Available from: </pmc/articles/PMC3251309/?report=abstract>
 85. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [Internet]. Vol. 19, *Nature Medicine*. NIH Public Access; 2013. p. 1423–37. Available from: </pmc/articles/PMC3954707/?report=abstract>
 86. Sánchez Sánchez L, Vicente Hernández Vázquez JM, Marure RL. PAPEL DE LAS CADHERINAS EN LA METÁSTASIS *.

87. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* [Internet]. 1999 Nov 1;147(3):631–43. Available from: [/pmc/articles/PMC2151177/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11736639/)
88. Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochem* [Internet]. 2001;66(10):1174–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11736639/>
89. Koch AW, Manzur KL, Shan W. Structure-based models of cadherin-mediated cell adhesion: The evolution continues [Internet]. Vol. 61, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag Basel; 2004. p. 1884–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15289931/>
90. Lee SW. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* [Internet]. 1996 Jul 1;2(7):776–82. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm0796-776>
91. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer [Internet]. Vol. 34, *Genes Chromosomes and Cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 2002. p. 255–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12007186/>
92. Kawaguchi J, Takeshita S, Kashima T, Imai T, Machinami R, Kudo A. Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1999;14(5):764–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320525/>
93. Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, Byers SW. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res* [Internet]. 2002;62(22):6688–97. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/22/6688.short>
94. Amann E. Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts Protein expression View project [Internet]. Article in *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/15034770>
95. 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* [Internet]. 2010 Jun 1;70(11):4580–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2923552/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19923552/)
96. Shibata T, Ochiai A, Gotoh M, Machinami R, Hirohashi S. Simultaneous expression of cadherin-11 in signet-ring cell carcinoma and stromal cells of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 1996 Feb 6;99(2):147–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8616818/>
97. Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 Is Expressed in Invasive Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1999;59(4).
98. M J Bussemakers 1, A Van Bokhoven, K Tomita, C F Jansen JAS. Complex cadherin expression in hu... preview & related info | Mendeley [Internet]. Available from: https://www.mendeley.com/catalogue/d6726cce-8d47-331f-bcb7-83d4c65243a8/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.4&utm_campaign=op

en_catalog&userDocumentId=%7B3524763b-60c5-359b-af3b-6aaf2b2fefe8%7D

99. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJLH, Ruijter ETG, Jansen CFJ, Bussemakers MJG, et al. Cadherin Switching in Human Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* 2000;60(13).
100. 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* [Internet]. 2008 Aug 1;6(8):1259–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18708358/>
101. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1991;113(1):173–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2007622/>
102. 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* [Internet]. 2010 May;221(1):68–76. Available from: </pmc/articles/PMC2936767/?report=abstract>
103. Best CJM, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GVR, Perlmutter MA, Gathright Y, et al. Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Oct 1;11(19 I):6823–34. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/;
104. Sjöberg E, Augsten M, Bergh J, Jirström K, Östman A. Expression of the chemokine CXCL14 in the tumour stroma is an independent marker of survival in breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2016 May 10;114(10):1117–24. Available from: </pmc/articles/PMC4865967/?report=abstract>
105. Balkwill F. Cancer and the chemokine network [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2004. p. 540–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15229479/>
106. Jöhrer K, Pleyer L, Olivier A, Maizner E, Zelle-Rieser C, Greil R. Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines [Internet]. Vol. 8, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Expert Opin Biol Ther; 2008. p. 269–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18294099/>
107. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* [Internet]. 2006 Apr;42(6):768–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16510280/>
108. Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis [Internet]. Vol. 26, *Cancer and Metastasis Reviews*. NIH Public Access; 2007. p. 453–67. Available from: </pmc/articles/PMC4237067/?report=abstract>
109. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Sep 4;203(9):2201–13. Available from: </pmc/articles/PMC2118398/?report=abstract>
110. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*

- [Internet]. 2005 May 6;121(3):335–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15882617/>
111. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 4;449(7162):557–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17914389/>
 112. Wu Y, Li Y-Y, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. CCL3-CCR5 Axis Regulates Intratumoral Accumulation of Leukocytes and Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Murine Lung Metastasis Process. *J Immunol* [Internet]. 2008 Nov 1;181(9):6384–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18941229/>
 113. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004 Jul 1;6(1):17–32.
 114. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, et al. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Nov 15;64(22):8262–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15548693/>
 115. Kurth I, Willmann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Sep 17;194(6):855–61. Available from: [/pmc/articles/PMC2195966/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2195966/?report=abstract)
 116. Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmi Z, Dahl R, Christopherson K, et al. The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol*. 2006 Aug 1;34(8):1101–5.
 117. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells [Internet]. Vol. 18, *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol; 2000. p. 767–811. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10837075/>
 118. Ishigami S, Natsugoe S, Matsumoto M, Okumura H, Sakita H, Nakashima S, et al. Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* [Internet]. 2003 Sep 1;10(5):1237–40. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.10.5.1237/abstract>
 119. Shurin G V., Ferris R, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, et al. Loss of New Chemokine CXCL14 in Tumor Tissue Is Associated with Low Infiltration by Dendritic Cells (DC), while Restoration of Human CXCL14 Expression in Tumor Cells Causes Attraction of DC Both In Vitro and In Vivo. *J Immunol* [Internet]. 2005 May 1;174(9):5490–8. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/174/9/5490>
 120. Schwarze SR, Luo J, Isaacs WB, Jarrard DF. Modulation of CXCL14 (BRAK) expression in prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2005 Jun 15;64(1):67–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15651028/>
 121. Williams KA, Lee M, Hu Y, Andreas J, Patel SJ, Zhang S, et al. A Systems

- Genetics Approach Identifies CXCL14, ITGAX, and LPCAT2 as Novel Aggressive Prostate Cancer Susceptibility Genes. Horwitz MS, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2014 Nov 20;10(11):e1004809. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004809>
122. Wenthe MN, Mayer C, Gaida MM, Michalski CW, Giese T, Bergmann F, et al. CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2008 Feb 8;259(2):209–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18054154/>
 123. Augsten M, Hägglöf 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* [Internet]. 2009 Mar 3;106(9):3414–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19218429/>
 124. Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E, et al. Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell xenografts. *Transgenic Res* [Internet]. 2010;19(6):1109–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20333465/>
 125. Pelicano H, Lu W, Zhou Y, Zhang W, Chen Z, Hu Y, et al. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Mar 15;69(6):2375–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19276362/>
 126. Hara T, Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals [Internet]. Vol. 151, *Journal of Biochemistry*. 2012. p. 469–76. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article/151/5/469/2182676>
 127. Song EY, Shurin MR, Tourkova IL, Gutkin DW, Shurin G V. Epigenetic mechanisms of promigratory chemokine CXCL14 regulation in human prostate cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jun 1;70(11):4394–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20460540/>
 128. Yang XY, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Izukuri K, Ikoma T, et al. C-X-C motif chemokine ligand 14 is a unique multifunctional regulator of tumor progression. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Apr 2;20(8):1872. Available from: </pmc/articles/PMC6514660/?report=abstract>
 129. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression [Internet]. Vol. 29, *Cancer and Metastasis Reviews*. NIH Public Access; 2010. p. 709–22. Available from: </pmc/articles/PMC3175097/?report=abstract>
 130. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* [Internet]. 2004 Aug 4;18(11):1240–2. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.03-0935fje>
 131. Miwa S, Mizokami A, Keller ET, Taichman R, Zhang J, Namiki M. The bisphosphonate YM529 inhibits osteolytic and osteoblastic changes and CXCR-4-induced invasion in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Oct

- 1;65(19):8818–25. Available from: www.aacrjournals.org
132. Conley-LaComb MK, Saliganan A, Kandagatla P, Chen YQ, Cher ML, Chinni SR. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling. *Mol Cancer* [Internet]. 2013 Jul 31;12(1):85. Available from: [/pmc/articles/PMC3751767/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3751767/?report=abstract)
 133. Wang Q, Diao X, Sun J, Chen Z. Regulation of VEGF, MMP-9 and metastasis by CXCR4 in a prostate cancer cell line. *Cell Biol Int* [Internet]. 2011 Sep 1;35(9):897–904. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1042/CBI20100744>
 134. Nakouzi N Al, Bawa O, le Pape A, Lerondel S, Gaudin C, Opolon P, et al. The IGR-CaP1 xenograft model recapitulates mixed osteolytic/ blastic bone lesions observed in metastatic prostate cancer. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2012;14(5):376–87. Available from: [/pmc/articles/PMC3384425/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3384425/?report=abstract)
 135. Sun YX, Fang M, Wang J, Cooper CR, Pienta KJ, Taichman RS. Expression and activation of $\alpha\beta 3$ integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* [Internet]. 2007 Jan 1;67(1):61–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pros.20500>
 136. Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4:1795. Available from: [/pmc/articles/PMC3649763/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3649763/?report=abstract)
 137. Luo J, Ok Lee S, Liang L, Huang CK, Li L, Wen S, et al. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* [Internet]. 2014 May 22;33(21):2768–78. Available from: www.nature.com/onc
 138. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2013 Jan;17(1):30–54. Available from: [/pmc/articles/PMC3560853/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3560853/?report=abstract)
 139. Guan G, Zhang Y, Lu Y, Liu L, Shi D, Wen Y, et al. The HIF-1 α /CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. *Cancer Lett*. 2015 Feb 1;357(1):254–64.
 140. Toyoma S, Suzuki S, Kawasaki Y, Yamada T. SDF-1/CXCR4 induces cell invasion through CD147 in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Oncol Lett* [Internet]. 2020 Aug 1;20(2):1817–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32724425>
 141. Gupta N, Duda DG. Role of stromal cell-derived factor 1 α pathway in bone metastatic prostate cancer [Internet]. Vol. 30, *Journal of Biomedical Research*. Nanjing Medical University; 2016. p. 181–5. Available from: [/pmc/articles/PMC4885164/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4885164/?report=abstract)
 142. Hiratsuka S, Duda DG, Huang Y, Goel S, Sugiyama T, Nagasawa T, et al. C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A [Internet]. 2011 Jan 4;108(1):302–7. Available from: /pmc/articles/PMC3017172/?report=abstract
143. Chen Y, Huang Y, Reiberger T, Duyverman AM, Huang P, Samuel R, et al. Differential effects of sorafenib on liver versus tumor fibrosis mediated by stromal-derived factor 1 alpha/C-X-C receptor type 4 axis and myeloid differentiation antigen-positive myeloid cell infiltration in mice. *Hepatology* [Internet]. 2014;59(4):1435–47. Available from: /pmc/articles/PMC3966948/?report=abstract
 144. Begley LA, MacDonald JW, Day ML, Macoska JA. CXCL12 activates a robust transcriptional response in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Sep 14;282(37):26767–74. Available from: <http://www.jbc.org/>
 145. Frigo DE, Sherk AB, Wittmann BM, Norris JD, Wang Q, Joseph JD, et al. Induction of Krüppel-like factor 5 expression by androgens results in increased CXCR4-dependent migration of prostate cancer cells in vitro. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2009 Sep;23(9):1385–96. Available from: /pmc/articles/PMC2737557/?report=abstract
 146. Edwards J, Bartlett JMS. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* [Internet]. 2005 Jun 1;95(9):1327–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2005.05527.x>
 147. Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM, Parker MG. The AF1 and AF2 Domains of the Androgen Receptor Interact with Distinct Regions of SRC1. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1999 Dec 1;19(12):8383–92. Available from: /pmc/articles/PMC84931/?report=abstract
 148. Kasina S, Macoska JA. The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012 Apr 4;351(2):249–63. Available from: /pmc/articles/PMC3307100/?report=abstract
 149. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Dec 17;274(51):36505–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10593948/>
 150. Aoyama A, Chen WT. A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(21):8296–300. Available from: /pmc/articles/PMC54942/?report=abstract
 151. 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* [Internet]. 2008 Jan 22;47(3):1076–86. Available from: /pmc/articles/PMC4696028/?report=abstract
 152. Yang X, Lin Y, Shi Y, Li B, Liu W, Yin W, et al. FAP Promotes immunosuppression by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Jul 15;76(14):4124–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27216177/>

153. Hintz H, Gallant J, Vander Griend D, Coleman I, Nelson P, LeBeau A. Imaging Fibroblast Activation Protein Alpha improves diagnosis of metastatic Prostate Cancer with Positron Emission Tomography. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020;clincanres.1358.2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32636317/>
154. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Beresford HR, Oettgen HF, Melamed MR, Old LJ. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: Differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(9):3110–4. Available from: </pmc/articles/PMC280153/?report=abstract>
155. Flier JS, Underhill LH, Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal [Internet]. Vol. 315, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society ; 1986. p. 1650–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198612253152606>
156. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo T-K, et al. Vascular Stroma Formation in Carcinoma in Situ, Invasive Carcinoma, and Metastatic Carcinoma of the Breast. *Clin Cancer Res*. 1999;5(5).
157. Iozzo R V. Tumor stroma as a regulator of neoplastic behavior. Agonistic and antagonistic elements embedded in the same connective tissue. [Internet]. Vol. 73, *Laboratory Investigation*. 1995. p. 157–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7637316/>
158. Hintz HM, Cowan AE, Shapovalova M, LeBeau AM. Development of a cross-reactive monoclonal antibody for detecting the tumor stroma. *Bioconj Chem* [Internet]. 2019 May 15;30(5):1466–76. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.bioconjchem.9b00206>
159. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(18):7235–9. Available from: </pmc/articles/PMC54718/?report=abstract>
160. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(7):2466–70. Available from: </pmc/articles/PMC53710/?report=abstract>
161. Brennen WN, Rosen DM, Wang H, Isaacs JT, Denmeade SR. Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2012 Sep 5;104(17):1320–34. Available from: </pmc/articles/PMC3529592/?report=abstract>
162. 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* [Internet]. 2014;74(13):1308–19. Available from: </pmc/articles/PMC4130904/?report=abstract>
163. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? [Internet]. Vol. 357, *Lancet*. Elsevier Limited; 2001. p. 539–45. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673600040460/fulltext>

164. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [Internet]. Vol. 144, Cell. Elsevier; 2011. p. 646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
165. Fujita K, Ewing CM, Sokoll LJ, Elliott DJ, Cunningham M, De Marzo AM, et al. Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation. Prostate [Internet]. 2008 Jun 1;68(8):872–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18361406/>
166. Bouraoui Y, Ricote M, García-Tuñón I, Rodriguez-Berriguete G, Touffehi M, Rais N Ben, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer. Cancer Detect Prev [Internet]. 2008;32(1):23–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400418/>
167. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. Hum Genomics [Internet]. 2010 Oct 1;5(1):30–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21106488/>
168. Xu GY, Yu HA, Hong J, Stahl M, McDonagh T, Kay LE, et al. Solution structure of recombinant human interleukin-6. J Mol Biol. 1997 May 2;268(2):468–81.
169. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. Int Rev Immunol [Internet]. 1998;16(3–4):249–84. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08830189809042997>
170. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. Cytokine Growth Factor Rev [Internet]. 2011 Apr;22(2):83–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21377916/>
171. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation [Internet]. Vol. 374, Biochemical Journal. Portland Press Ltd; 2003. p. 1–20. Available from: [/pmc/articles/PMC1223585/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1223585/?report=abstract)
172. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer [Internet]. Vol. 14, Trends in Molecular Medicine. Trends Mol Med; 2008. p. 109–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18261959/>
173. Zhang H, Xu Y, Li L, Liu R, Ma B. The interleukin-6 -174G/C polymorphism and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. Urol Int [Internet]. 2012 Jun;88(4):447–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22516897/>
174. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6) [Internet]. Vol. 113, BJU International. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 986–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24053309/>
175. Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. Cancer Res [Internet]. 1997;57(1):141–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8988055/>
176. TD C, JJ Y, MT S, M B, JW S. Characterization of the role of IL-6 in the

- progression of prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 1999;38(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10068344/>
177. Steiner H, Godoy-Tundidor S, Rogatsch H, Berger AP, Fuchs D, Comuzzi B, et al. Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Pathol* [Internet]. 2003 Feb 1;162(2):655–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12547723/>
 178. Shariat SF, Chromecki TF, Hoefler J, Barbieri CE, Scherr DS, Karakiewicz PI, et al. Soluble gp130 regulates prostate cancer invasion and progression in an interleukin-6 dependent and independent manner. *J Urol* [Internet]. 2011 Nov;186(5):2107–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21944124/>
 179. Morrissey C, Lai JS, Brown LG, Wang YC, Roudier MP, Coleman IM, et al. The expression of osteoclastogenesis-associated factors and osteoblast response to osteolytic prostate cancer cells. *Prostate* [Internet]. 2010 Mar 1;70(4):412–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19866469/>
 180. 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* [Internet]. 2003 Jan 1;9(1 I):370–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12538490/>
 181. 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* [Internet]. 2006 Mar 15;66(6):3087–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540658/>
 182. Niradiz Reyes CO. Inflammation and prostate cancer: Biological implications and clinical usefulness [Internet]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932014000100008
 183. (1) Flores-García Y, Talamás-Rohana P. (2012) Interleucina 17 funciones biológicas y su receptor. Yevel Flores-García y Patricia Talamás-Rohana.
 184. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions [Internet]. Vol. 7, *Cellular and Molecular Immunology*. Cell Mol Immunol; 2010. p. 164–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383173/>
 185. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* [Internet]. 1995;3(6):811–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8777726/>
 186. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [Internet]. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access; 2009. p. 556–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821718/>
 187. Vykhovanets E V, Maclennan GT, Vykhovanets O V, Gupta S. IL-17 Expression by macrophages is associated with proliferative inflammatory atrophy lesions in prostate cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2011 Aug 15;4(6):552–

65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904631>
188. Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* [Internet]. 2003 Aug 1;56(3):171–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12772186/>
 189. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease [Internet]. Vol. 129, *Immunology*. Wiley-Blackwell; 2010. p. 311–21. Available from: </pmc/articles/PMC2826676/?report=abstract>
 190. Zhang Q, Liu S, Parajuli KR, Zhang W, Zhang K, Mo Z, et al. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* [Internet]. 2017 Feb 2;36(5):687–99. Available from: </pmc/articles/PMC5213194/?report=abstract>
 191. Fabre J, Giustiniani J, Garbar C, Antonicelli F, Merrouche Y, Bensussan A, et al. Targeting the tumor microenvironment: The protumor effects of IL-17 related to cancer type [Internet]. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016. Available from: </pmc/articles/PMC5037712/?report=abstract>
 192. Janiczek M, Szyłberg Ł, Antosik P, Kasperska A, Marszałek A. Expression Levels of IL-17A, IL-17F, IL-17RA, and IL-17RC in Prostate Cancer with Taking into Account the Histological Grade according to Gleason Scale in Comparison to Benign Prostatic Hyperplasia: In Search of New Therapeutic Options. *J Immunol Res* [Internet]. 2020;2020. Available from: </pmc/articles/PMC7267874/?report=abstract>
 193. Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Hari Reddi A. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Feb 8;277(6):4309–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11706037/>
 194. Zhang Q, Liu S, Zhang Q, Xiong Z, Wang AR, Myers L, et al. Interleukin-17 promotes development of castration-resistant prostate cancer potentially through creating an immunotolerant and pro-angiogenic tumor microenvironment. *Prostate* [Internet]. 2014;74(8):869–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24691769/>
 195. Luo YQ, Wang D, Gong T, Zhu J. An updated meta-analysis of 37 case-control studies on the association between NFKB1 -94ins/del ATTG promoter polymorphism and cancer susceptibility [Internet]. Vol. 7, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2016. p. 58659–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27463002/>
 196. Sen R, Baltimore D. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2013 Aug 29;12(86):1–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3091258/>
 197. Karin M, Greten FR. NF-κB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression [Internet]. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2005. p. 749–59. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri1703>

198. Blackwell TS, Christman JW. The Role of Nuclear Factor- κ B in Cytokine Gene Regulation [Internet]. Vol. 17, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. American Lung Association; 1997. p. 3–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9224203/>
199. Concetti J, Wilson CL. NFKB1 and Cancer: Friend or Foe? Cells [Internet]. 2018 Sep 7;7(9):133. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30205516/>
200. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, et al. Canonical pathway of nuclear factor κ B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 Apr 13;101(15):5634–9. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401060101
201. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [Internet]. Vol. 12, Molecular Cancer. Mol Cancer; 2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23915189/>
202. Alvero AB, Chen R, Fu HH, Montagna M, Schwartz PE, Rutherford T, et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravel the mechanisms for repair and chemo-resistance. Cell Cycle [Internet]. 2009 Jan 1;8(1):158–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158483/>
203. Schmitt AM, Crawley CD, Kang S, Raleigh DR, Yu X, Wahlstrom JS, et al. P50 (NF- κ B1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. Mol Cell [Internet]. 2011 Dec 9;44(5):785–96. Available from: </pmc/articles/PMC3240852/?report=abstract>
204. Yenmis G, Oner T, Cam C, Koc A, Kucuk OS, Yakicier MC, et al. Association of NFKB1 and NFKBIA polymorphisms in relation to susceptibility of behçet’s disease. Scand J Immunol [Internet]. 2015 Jan 1;81(1):81–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25367031/>
205. Han X, Zhang JJ, Yao N, Wang G, Mei J, Li B, et al. Polymorphisms in NFKB1 and NFKBIA genes modulate the risk of developing prostate cancer among han chinese. Med Sci Monit [Internet]. 2015 Jun 12;21:1707–15. Available from: </pmc/articles/PMC4473804/?report=abstract>
206. Chen CD, Sawyers CL. NF- κ B Activates Prostate-Specific Antigen Expression and Is Upregulated in Androgen-Independent Prostate Cancer. Mol Cell Biol [Internet]. 2002 Apr 15;22(8):2862–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11909978/>
207. Domingo-Domenech J, Mellado B, Ferrer B, Truan D, Codony-Servat J, Sauleda S, et al. Activation of nuclear factor- κ B in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. Br J Cancer [Internet]. 2005 Nov 28;93(11):1285–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16278667/>
208. 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 [Internet]. 2013 Apr 5;8(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23577181/>
209. 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 [Internet]. 2019 Sep 6;8(9). Available from: /pmc/articles/PMC6770108/?report=abstract
210. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2014. p. 736–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3818>
 211. Cocchiola R, Rubini E, Altieri F, Chichiarelli S, Paglia G, Romaniello D, et al. STAT3 post-translational modifications drive cellular signaling pathways in prostate cancer cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Apr 2;20(8). Available from: /pmc/articles/PMC6514970/?report=abstract
 212. Srivastava J, DiGiovanni J. Non-canonical Stat3 signaling in cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2016 Dec 1;55(12):1889–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.22438>
 213. Yan S, Lim SJ, Shi S, Dutta P, Li WX. Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability. *FASEB J* [Internet]. 2011 Jan;25(1):232–41. Available from: /pmc/articles/PMC3005427/?report=abstract
 214. Zhang Q, Raje V, Yakovlev VA, Yacoub A, Szczepanek K, Meier J, et al. Mitochondrial localized Stat3 promotes breast cancer growth via phosphorylation of serine 727. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Oct 25;288(43):31280–8. Available from: /pmc/articles/PMC3829438/?report=abstract
 215. Camporeale A, Demaria M, Monteleone E, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P, et al. STAT3 activities and energy metabolism: Dangerous liaisons. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2014;6(3):1579–96. Available from: /pmc/articles/PMC4190557/?report=abstract
 216. Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, et al. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 May 1;284(18):12349–62. Available from: /pmc/articles/PMC2673303/?report=abstract
 217. Guanizo AC, Fernando CD, Garama DJ, Gough DJ. STAT3: a multifaceted oncoprotein [Internet]. Vol. 36, *Growth Factors*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 1–14. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08977194.2018.1473393>
 218. Kesanakurti D, Chetty C, Rajasekhar Maddirela D, Gujrati M, Rao JS. Essential role of cooperative NF- κ B and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. *Oncogene* [Internet]. 2013;32(43):5144–55. Available from: /pmc/articles/PMC3664652/?report=abstract
 219. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2010 Feb;21(1):11–9. Available from: /pmc/articles/PMC2834864/?report=abstract
 220. Sekine Y, Yumioka T, Yamamoto T, Muromoto R, Imoto S, Sugiyama K, et al. Modulation of TLR4 Signaling by a Novel Adaptor Protein Signal-Transducing Adaptor Protein-2 in Macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2006 Jan 1;176(1):380–9. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/176/1/380>

221. Laudisi F, Cherubini F, Monteleone G, Stolfi C. STAT3 interactors as potential therapeutic targets for cancer treatment [Internet]. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018. Available from: </pmc/articles/PMC6032216/?report=abstract>
222. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor [Internet]. Vol. 13, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2012. p. 283–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3330>
223. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature [Internet]. 2005 Aug 4;436(7051):725–30. Available from: </pmc/articles/PMC1939938/?report=abstract>
224. Pencik J, Schlederer M, Gruber W, Unger C, Walker SM, Chalaris A, et al. STAT3 regulated ARF expression suppresses prostate cancer metastasis. Nat Commun [Internet]. 2015 Jul 22;6. Available from: </pmc/articles/PMC4525303/?report=abstract>
225. Hudes G, Tagawa ST, Whang YE, Qi M, Qin X, Puchalski TA, et al. A phase 1 study of a chimeric monoclonal antibody against interleukin-6, siltuximab, combined with docetaxel in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Invest New Drugs [Internet]. 2013 Jun 25;31(3):669–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-012-9857-z>
226. Hubackova S, Novakova Z, Krejcikova K, Kosar M, Dobrovolna J, Duskova P, et al. Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling. Cell Cycle [Internet]. 2010 Aug 1;9(15):3157–71. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.9.15.12521>
227. Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To KH, et al. Stapled α -helical peptide drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013 Sep 3;110(36):E3445. Available from: </pmc/articles/PMC3767549/?report=abstract>
228. Hellsten R, Lilljebjörn L, Johansson M, Leandersson K, Bjartell A. The STAT3 inhibitor galiellalactone inhibits the generation of MDSC-like monocytes by prostate cancer cells and decreases immunosuppressive and tumorigenic factors. Prostate [Internet]. 2019;79(14):1611–21. Available from: </pmc/articles/PMC6771992/?report=abstract>
229. Canesin G, Evans-Axelsson S, Hellsten R, Sterner O, Krzyzanowska A, Andersson T, et al. The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Effectively Reduces Tumor Growth and Metastatic Spread in an Orthotopic Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. Eur Urol [Internet]. 2016 Mar 1;69(3):400–4. Available from: <http://www.europeanurology.com/article/S0302283815005199/fulltext>
230. Luo J, Wang K, Yeh S, Sun Y, Liang L, Xiao Y, et al. LncRNA-p21 alters the antiandrogen enzalutamide-induced prostate cancer neuroendocrine differentiation via modulating the EZH2/STAT3 signaling. Nat Commun [Internet]. 2019 Dec 1;10(1). Available from: </pmc/articles/PMC6561926/?report=abstract>

231. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones [Internet]. Vol. 9, Annual Review of Cell Biology. Annu Rev Cell Biol; 1993. p. 601–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8280473/>
232. Wu C. Heat shock transcription factors: Structure and regulation [Internet]. Vol. 11, Annual Review of Cell and Developmental Biology. Annual Reviews Inc.; 1995. p. 441–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8689565/>
233. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1991;88(16):6906–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1871105/>
234. Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. Mol Cell Biol [Internet]. 1993 Apr;13(4):2486–96. Available from: </pmc/articles/PMC359569/?report=abstract>
235. Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. J Cell Sci [Internet]. 2014 Jan 15;127(2):261–6. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/127/2/261>
236. Kijima T, Prince T, Neckers L, Koga F, Fujii Y. Heat shock factor 1 (HSF1)-targeted anticancer therapeutics: overview of current preclinical progress [Internet]. Vol. 23, Expert Opinion on Therapeutic Targets. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 369–77. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14728222.2019.1602119>
237. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. Cell [Internet]. 2007 Sep 21;130(6):1005–18. Available from: </pmc/articles/PMC2586609/?report=abstract>
238. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM, et al. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. Cell [Internet]. 2012 Aug 3;150(3):549–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22863008/>
239. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM, et al. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. Cell [Internet]. 2012 Aug 3;150(3):549–62. Available from: </pmc/articles/PMC3438889/?report=abstract>
240. Björk JK, Åkerfelt M, Joutsen J, Puustinen MC, Cheng F, Sistonen L, et al. Heat-shock factor 2 is a suppressor of prostate cancer invasion. Oncogene [Internet]. 2016 Apr 7;35(14):1770–84. Available from: </pmc/articles/PMC4830906/?report=abstract>
241. 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 [Internet]. 2014 Jun 1;81(6):514–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22318>
242. Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, et al. Induction of heat shock proteins by heregulin β 1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. Oncogene [Internet]. 2005 Sep 29;24(43):6564–73. Available from: www.nature.com/onc

243. Ferrari N, Ranftl R, Chicherova I, Slaven ND, Moeendarbary E, Farrugia AJ, et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1;10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6328607/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3528607/)
244. Wang Q, Zhang YC, Zhu LF, Pan L, Yu M, Shen WL, et al. Heat shock factor 1 in cancer-associated fibroblasts is a potential prognostic factor and drives progression of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* [Internet]. 2019 May 1;110(5):1790–803. Available from: [/pmc/articles/PMC6501034/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3501034/)
245. Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabinran SK, et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;156(3):857–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10702402/>
246. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, et al. Heat Shock Protein Expression Independently Predicts Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2000;60(24).
247. Asea A, Ara G, Teicher BA, Stevenson MA, Calderwood SK. Effects of the flavonoid drug Quercetin on the response of human prostate tumours to hyperthermia in vitro and in vivo. *Int J Hyperth* [Internet]. 2001;17(4):347–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11471985/>
248. Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Vydra N, Cortez AJ, Filipczak PT, Krawczyk Z, et al. Functional redundancy of HSPA1, HSPA2 and other HSPA proteins in non-small cell lung carcinoma (NSCLC); an implication for NSCLC treatment. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1;9(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50840-7>
249. Locke M. La respuesta celular al estrés al ejercicio: papel de las proteínas del estrés - PubMed [Internet]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9213090/>
250. Tanguay RM, Wu Y, Khandjian EW. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet* [Internet]. 1993;14(2):112–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8482015/>
251. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* (80-) [Internet]. 1989;246(4928):382–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2799391/>
252. Åkerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan [Internet]. Vol. 11, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2010. p. 545–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20628411/>
253. Powers M V., Jones K, Barillari C, Westwood I, Van Montfort RLM, Workman P. Targeting HSP70: The second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? [Internet]. Vol. 9, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2010. p. 1542–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20372081/>
254. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* [Internet]. 2000

- Apr;6(4):435–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10742151/>
255. Guerrero-Rojas R, Guerrero-Fonseca C. Molecular mechanisms of heat shock proteins (HSPs) involved in neoplasm development [Internet]. Vol. 34, Salud Uninorte. Universidad del Norte; 2018. p. 455–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.14482/sun.34.2.616.98>
 256. Praneeth Silva TM. (PDF) El papel de las proteínas de choque térmico en el cáncer [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/336170837_The_Role_of_Heat_Shock_Proteins_in_Cancer
 257. Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. Vol. 325, Cancer Letters. Elsevier; 2012. p. 117–24.
 258. Seo JS, Park YM, Kim J Il, Shim EH, Kim CW, Jang JJ, et al. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 17;218(2):582–7.
 259. Hoter A, Rizk S, Naim HY. The multiple roles and therapeutic potential of molecular chaperones in prostate cancer [Internet]. Vol. 11, Cancers. MDPI AG; 2019. Available from: </pmc/articles/PMC6721600/?report=abstract>
 260. 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* [Internet]. 2005 May 5;24(20):3328–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15735699/>
 261. 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* [Internet]. 2012 Mar 23;287(13):10051–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315230/>
 262. Hurwitz MD, Kaur P, Nagaraja GM, Bausero MA, Manola J, Asea A. Radiation therapy induces circulating serum Hsp72 in patients with prostate cancer. *Radiother Oncol* [Internet]. 2010 Jun;95(3):350–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20430459/>
 263. Berg CD, Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Mar 26;360(13):1310–9. Available from: </pmc/articles/PMC2944770/?report=abstract>
 264. Torrealba N, Vera R, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Paniagua R, Royuela M. TGF- β /PI3K/AKT/mTOR/NF-kB pathway. Clinicopathological features in prostate cancer. *Aging Male* [Internet]. 2019; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30973040/>
 265. Sasaki T, Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, et al. Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Lab Invest* [Internet]. 2016 Mar 1;96(3):338–49. Available from: www.laboratoryinvestigation.org
 266. Ishii K, Matsuoka I, Sasaki T, Nishikawa K, Kanda H, Imai H, et al. Loss of

- Fibroblast-Dependent Androgen Receptor Activation in Prostate Cancer Cells is Involved in the Mechanism of Acquired Resistance to Castration. *J Clin Med* [Internet]. 2019 Sep 3;8(9):1379. Available from: [/pmc/articles/PMC6780155/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36780155/)
267. 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* [Internet]. 2013 Jun 1;42(6):2116–22. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.1892>
 268. Ishii K, Mizokami A, Tsunoda T, Iguchi K, Kato M, Hori Y, et al. Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Dec 1;112(12):3604–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.23291>
 269. Ishii K, Imamura T, Iguchi K, Arase S, Yoshio Y, Arima K, et al. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth in vivo. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2009 Jun 1;16(2):415–28. Available from: www.endocrinology-journals.org
 270. Halin S, Hammarsten P, Wikström P, Bergh A. Androgen-insensitive prostate cancer cells transiently respond to castration treatment when growing in an androgen-dependent prostate environment. *Prostate* [Internet]. 2007 Mar 1;67(4):370–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20473>
 271. 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* [Internet]. 2012 Oct;135(3):725–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22910931/>
 272. Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata RI. BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomed Res* [Internet]. 2009 Oct;30(5):315–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887729/>
 273. Culig Z, Pühr M. Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018 Feb 15;462(Pt A):25–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28315704/>
 274. 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* [Internet]. 2005 Mar;10(1):46–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15832947/>
 275. Rettig WJ, Su SL, Fortunato SR, Scanlan MJ, Mohan Raj BK, Garin-Chesa P, et al. Fibroblast activation protein: Purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int J Cancer* [Internet]. 1994;58(3):385–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7519584/>
 276. 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*

- [Internet]. 2006 Jan 3;103(1):71–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16122891/>
277. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [Internet]. Vol. 107, *Blood*. American Society of Hematology; 2006. p. 1761–7. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/107/5/1761/469104/zh800506001761.pdf>
 278. Dominska K, Kowalska K, Matysiak ZE, Płuciennik E, Ochędalski T, Piastowska-Ciesielska AW. Regulation of mRNA gene expression of members of the NF- κ B transcription factor gene family by angiotensin II and relaxin 2 in normal and cancer prostate cell lines. *Mol Med Rep* [Internet]. 2017 Jun 1;15(6):4352–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487955/>
 279. Pignot G, Maillet D, Gross E, Barthelemy P, Beauval JB, Constans-Schlurmann F, et al. Systemic treatments for high-risk localized prostate cancer [Internet]. Vol. 15, *Nature Reviews Urology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 498–510. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29765147/>
 280. 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 Apr 1;71(4):618–29.
 281. Jang TL, Patel N, Faiena I, Radadia KD, Moore DF, Elsamra SE, et al. Comparative effectiveness of radical prostatectomy with adjuvant radiotherapy versus radiotherapy plus androgen deprivation therapy for men with advanced prostate cancer. *Cancer* [Internet]. 2018 Oct 15;124(20):4010–22. Available from: </pmc/articles/PMC6234085/?report=abstract>

10. Anexos

10.1 ANEXO I

Nombre del Médico que le informa:

Fecha:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

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

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

DESTINO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO OBTENIDAS EN LA BIOPSIA

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

NATURALEZA DE LA INVESTIGACIÓN

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

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

CONFIDENCIALIDAD

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

COSTES/COMPENSACIÓN

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

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR ESTE ESTUDIO

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

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

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

AUTORIZACIÓN DEL PACIENTE

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

Firma del paciente

Firma del médico

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

FirmaD.N.I.
.....

Testigos:

NombreD.N.I.
.....

Firma del médico