



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en
CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**Caracterización clínica y molecular del cáncer
de próstata en pacientes con mutaciones
germinales en *BRCA2***

FERNANDO LÓPEZ CAMPOS

Directores de Tesis
David Olmos Hidalgo
Elena Castro Marcos

Madrid, 2021



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en
CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**Caracterización clínica y molecular del cáncer
de próstata en pacientes con mutaciones
germinales en *BRCA2***

FERNANDO LÓPEZ CAMPOS

Directores de Tesis
David Olmos Hidalgo
Elena Castro Marcos

Madrid, 2021

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. David Olmos Hidalgo y la Dra. Elena Castro Marcos, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y por su excelente dirección. Agradezco a la Dra. Elena Castro la ilusión que me ha transmitido a lo largo de todos estos años por la investigación, sus enseñanzas, su plena disposición para ayudarme siempre que lo he necesitado y su capacidad para sacar siempre la parte positiva de todas las cosas. Al Dr. David Olmos, por acogerme en su laboratorio y hacerme sentir uno más desde el primer momento, por su confianza y apoyo, por todas sus explicaciones y reflexiones que me han hecho aprender tanto durante este tiempo. Es difícil encontrar una figura que pueda representar mejor a un "Mentor" que la suya. Sin ti, esto no hubiera sido posible, GRACIAS.

A todos y cada uno de los compañeros que en este periodo han pasado por el grupo de Cáncer de Próstata y que tanto me han enseñado, no es fácil para un clínico "aterrizar" y vosotros habéis conseguido que todo fuera más fácil.

A mis amigos, por todos los momentos, anécdotas y experiencias que hemos vivido, porque una persona es lo que es también por la gente que la rodea.

A mi familia, mis padres, mi hermana y mis tíos porque me habéis enseñado a ser quien soy, con todo vuestro cariño y paciencia. Agradezco a mis padres el haberme enseñado la importancia de ser constante y trabajar duro para conseguir mis objetivos, habéis hecho hasta lo imposible para que mi hermana y yo tuviéramos siempre las mejores oportunidades. A mi hermana por ser la mejor hermana, por todos los momentos que hemos pasado juntos y los que nos quedan por pasar. A mi tío Serafín por estar siempre ahí, guiándome y apoyándome constantemente.

A mis abuelos, a mi tía Toñi, porque sé que estarías orgullosos de mí y aunque no estéis ya con nosotros, nunca os olvido.

A Nuria, por ser como eres, por tu amor incondicional, por escucharme siempre, comprenderme, apoyarme, conseguir que cada día merezca la pena. Sin duda esto, y tantas otras cosas, no serían posibles sin ti. Nunca cambies.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Lola y Fernando.

A Nuria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	23 -
1.1 EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL	- 25 -
1.2 GRUPOS DE RIESGO Y TRATAMIENTO EN CÁNCER DE PRÓSTATA	- 26 -
1.3 TRATAMIENTO ENFERMEDAD LOCALIZADA CON INTENCIÓN CURATIVA	- 28 -
1.3.1 PROSTATECTOMÍA RADICAL.....	- 28 -
1.3.2 TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO	- 29 -
1.3.3 HT NEOADYUVANTE Y ADYUVANTE A LA RADIOTERAPIA	- 30 -
1.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD AVANZADA	- 31 -
1.5 BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA Y TRASLACIÓN A LA MEDICINA PERSONALIZADA .	- 33 -
1.5.1 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA	- 36 -
1.5.2 ALTERACIONES EN LAS VÍAS DE REPARACIÓN DEL DNA	- 41 -
1.5.3 MUTACIONES GEMINALES EN GENES IMPLICADOS EN DDR	- 44 -
1.5.4 OTROS MARCADORES GENÓMICOS CON POSIBLE UTILIDAD PRONÓSTICA.....	- 50 -
1.5.4.1 <i>RB1</i>	- 51 -
1.5.4.2 AMPLIFICACIÓN <i>MYC</i>	- 53 -
1.5.4.3 <i>PTEN</i>	- 54 -
1.5.4.4 REORDENAMIENTO <i>TMPRSS2-ERG</i>	- 57 -
2 HIPÓTESIS	61 -
3 OBJETIVOS	65 -
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	- 67 -
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	- 67 -
4 MATERIAL Y MÉTODOS	69 -
4.1 TIPO DE ESTUDIO	- 71 -
4.2 POBLACIÓN A ESTUDIO	- 71 -
4.3 TAMAÑO MUESTRAL	- 72 -
4.4 SELECCIÓN DE SUJETOS PARA EL ESTUDIO	- 72 -
4.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	- 72 -
4.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	- 72 -
4.4.3 SELECCIÓN DE CONTROLES	- 73 -
4.5 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	- 73 -
4.5.1 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	- 73 -
4.5.2 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGUIMIENTO	- 74 -
4.5.3 MEDICIÓN DE OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y/O ANALÍTICAS	- 75 -

4.6	MUESTRAS TUMORALES Y PROCESAMIENTO DE LAS MISMAS.....	- 75 -
4.7	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	- 75 -
4.8	ESTADÍSTICA.....	- 88 -
4.9	PROTECCIÓN DE DATOS	- 89 -
4.10	ASPECTOS ÉTICOS	- 90 -
5	RESULTADOS.....	- 92 -
5.1	DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES INCLUIDOS	- 94 -
5.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES.....	- 95 -
5.3	REPRESENTACIÓN MUTACIONES GERMINALES EN BRCA2 Y BRCA1	- 96 -
5.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	- 96 -
5.5	VALIDACIÓN PRONÓSTICA DE MUTACIONES GERMINALES BRCA2.....	- 100 -
5.6	VALIDACIÓN PRONÓSTICA DE ALTERACIONES SOMÁTICAS	- 103 -
5.6.1	<i>RB1</i>	- 103 -
5.6.2	<i>BRCA2</i>	- 106 -
5.6.3	AMPLIFICACIÓN <i>MYC</i>	- 109 -
5.6.4	<i>PTEN</i>	- 111 -
5.6.5	REORDENAMIENTO <i>TMPRSS-ERG</i>	- 113 -
5.7	CORRELACIÓN Y CONCORDANCIA	- 115 -
5.8	MODELOS PRONÓSTICOS INTEGRANDO MUTACIONES SOMÁTICAS Y GERMINALES EN PACIENTES CON Y SIN MUTACIONES EN <i>BRCA</i>	- 119 -
5.9	CO-DELECIÓN <i>BRCA2-RB1</i> Y AMPLIFICACIÓN <i>MYC</i> . ANÁLISIS POR SUBGRUPOS.	- 121 -
6	DISCUSIÓN.....	- 136 -
6.1	RESULTADOS EN LA LÍNEA GERMINAL	- 138 -
6.2	RESULTADOS EN LA LÍNEA SOMÁTICA	- 141 -
6.2.1	<i>BRCA2</i> y <i>RB1</i>	- 141 -
6.2.2	AMPLIFICACIÓN <i>MYC</i>	- 143 -
6.2.3	<i>PTEN</i>	- 144 -
6.2.4	REORDENAMIENTO <i>TMPRSS2-ERG</i>	- 145 -
6.3	LIMITACIONES GENERALES DEL ESTUDIO	- 147 -
7	CONCLUSIONES.....	- 152 -
8	BIBLIOGRAFÍA	- 156 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM del CaPr adoptado por el American Joint Committee on Cancer.....	- 27 -
Tabla 2. Grupos de riesgo de D'Amico en CaPr.....	- 28 -
Tabla 3. Prevalencia de mutaciones germinales en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA en los estudios publicados.....	- 47 -
Tabla 4. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.	- 95 -
Tabla 5. Caracterización molecular de los pacientes incluidos en el estudio.....	- 97 -
Tabla 6. Clasificación molecular realizada por FISH de pacientes portadores de mutaciones germinales en <i>BRCA2</i> (arriba), no portadores de mutaciones germinales en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> (<i>izquierda</i>) y portadores de mutaciones germinales en <i>BRCA1</i> (abajo).....	- 98 -
Tabla 7. Correlación y Concordancia entre alteraciones en <i>BRCA2</i> , <i>BRCA1</i> , <i>RB1</i> y <i>13q</i>	- 115 -
Tabla 8. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia Cáncer Específica.	- 119 -
Tabla 9. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia libre de Resistencia a la Castración.....	- 120 -
Tabla 10. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia libre de Progresión Metastásica.	- 121 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis integral de las alteraciones somáticas y de la línea germinal en pacientes con CPRCm obtenido a través de técnicas de secuenciación. Robinson et al. Cell, 2015.	- 35 -
Figura 2. Diagrama de la estructura del gen <i>BRCA2</i>	- 42 -
Figura 3. Inactivación bialélica por tipo tumoral y mecanismo de la misma (A) y por origen de la mutación (B). Adaptación de Jonsson et al. Nature, 2019.	- 43 -
Figura 4. Modelo de letalidad sintética en respuesta a inhibidores de <i>PARP</i>	- 49 -
Figura 5. BACs utilizados para la elaboración de las sondas empleadas en la determinación de <i>TMPRSS2-ERG</i> mediante FISH.	- 80 -
Figura 6. Evaluación de la pérdida de <i>RB1</i> por FISH.....	- 83 -
Figura 7. Evaluación de la amplificación y ganancia de <i>MYC</i> por FISH.	- 84 -
Figura 8. Evaluación de la pérdida de <i>BRCA2</i> por FISH.	- 85 -
Figura 9. Evaluación de la pérdida de <i>PTEN</i> por FISH.	- 86 -
Figura 10. Evaluación del reordenamiento <i>TMPRSS2-ERG</i> por FISH.	- 88 -
Figura 11. Diagrama de flujo de selección de pacientes incluidos en el análisis final.	- 94 -
Figura 12. Representación de las mutaciones germinales <i>BRCA2</i> identificadas en el estudio en función del tipo de mutación y su localización.	- 96 -
Figura 13. Representación de las mutaciones germinales <i>BRCA1</i> identificadas en el estudio en función del tipo de mutación y su localización.	- 96 -
Figura 14. A) Imagen FISH de la pérdida <i>sBRCA2</i> , flecha izquierda pérdida homocigota, flecha derecha pérdida heterocigota. B) Imagen FISH de la pérdida <i>sRB1</i> , flecha izquierda pérdida heterocigota, flecha derecha pérdida homocigota.	- 99 -
Figura 15. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes portadores de mutación <i>gBRCA2</i> , <i>gBRCA1</i> y no portadores.	- 101 -
Figura 16. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes portadores de mutación <i>gBRCA2</i> , <i>gBRCA1</i> y no portadores.	- 102 -
Figura 17. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes portadores de mutación <i>gBRCA2</i> , <i>gBRCA1</i> y no portadores.....	- 103 -
Figura 18. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida <i>RB1</i>	- 104 -
Figura 19. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida <i>sBRCA2</i>	- 107 -

Figura 20. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con amplificación de <i>MYC</i>	110 -
Figura 21. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida de <i>PTEN</i>	112 -
Figura 22. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con reordenamiento <i>TMPRSS-ERG</i> ...	114 -
Figura 23. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	117 -
Figura 24. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	123 -
Figura 25. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	124 -
Figura 26. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	125 -
Figura 27. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	126 -
Figura 28. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	127 -
Figura 29. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin co-delección <i>BRCA2-RB1</i>	128 -
Figura 30. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	129 -
Figura 31. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	130 -
Figura 32. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes con mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	131 -
Figura 33. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	132 -
Figura 34. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	133 -
Figura 35. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes sin mutaciones <i>gBRCA2</i> con y sin amplificación de <i>MYC</i>	134 -

LISTADO DE ABREVIATURAS

AR: Receptor Androgénico

ARNm: ARN mensajero

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: ATM-Rad

BACs: Cromosomas artificiales bacterianos

BER: Reparación por escisión de bases

CaPr: Cáncer de próstata

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

CNA: Alteración en el número de copias

CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración

CPRCm: Cáncer de próstata resistente a la castración metastásico

CTCs: Células tumorales circulantes

DDR: Mecanismos de reparación del daño en el DNA

DNA-PK: Proteína quinasa dependiente de DNA

DSB: Rupturas de doble cadena

DSBR: Reparación de rupturas de doble cadena

EAU: Asociación Europea de Urología

EBRT: External Beam Radiation Therapy

FISH: Hibridación fluorescente in situ

gBRCA1: Mutaciones germinales en *BRCA1*

gBRCA2: Mutaciones germinales en *BRCA2*

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

IMRT: Intensity-modulated radiation therapy

INE: Instituto Nacional de Estadística

iSRA: Inhibidores de señalización del receptor de andrógenos

LHRH: Hormona liberadora de la hormona luteinizante

LOH: Pérdida de heterocigosidad

MMR: Reparación por Mismatch Repair

NA: No alcanzado

NCCN: National Cancer Comprehensive Network

NER: Reparación por excisión de nucleótidos

NHEJ: Recombinación no homóloga

PSA: Antígeno específico prostático

PSADT: Tiempo de duplicación de PSA

REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

RH: Recombinación Homóloga

RT-3D: Radioterapia tridimensional convencional

sBRCA2: Mutaciones somáticas en *BRCA2*

SCE: Supervivencia cáncer específica

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SG: Supervivencia global

SLPM: Supervivencia libre de progresión metastásica

SLRC: Supervivencia libre de resistencia a la castración

TCGA: Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer

TDA: Terapia de deprivación androgénica

TNM: Tumor-node-metastasis

1.INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL

El cáncer constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial, identificándose como un problema de salud de primera línea. El número total de nuevos casos diagnosticados de cáncer, estimados para 2020 en España es de 277.394, un 12% más que en el año 2015, cuando se diagnosticaron 247.771, según el informe “Las cifras del cáncer en España 2020”, realizado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), con datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)^[1]. Factores como el constante incremento de tamaño poblacional, la exposición a factores de riesgo, el envejecimiento de la población y el aumento de la detección precoz, han contribuido a consolidar dicha tendencia ascendente.

Concretamente en España, se estima una incidencia de nuevos casos diagnosticados de cáncer de próstata (CaPr) para 2020 de 35.126, situándose como la patología tumoral más frecuentemente diagnosticada en varones seguida del cáncer colorectal, pulmón y de vejiga urinaria^[2]. De hecho, es importante señalar el aumento de la incidencia de CaPr en las dos últimas décadas, representando un problema creciente a medida que la población mundial envejece, ya que su incidencia está estrechamente relacionada con la edad^[3]. En consecuencia, se estima que en 2025 uno de cada seis varones residentes en los países desarrollados será diagnosticado de CaPr.

Así mismo, de manera global en los últimos años apreciamos una migración del diagnóstico del CaPr hacia estadios más precoces de la enfermedad, de hecho, la mayoría de los tumores de próstata no son potencialmente mortales. Se estima que en nuestro medio, solo un 3,7% de los pacientes diagnosticados son metastásicos al diagnóstico^[4].

La utilización del antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés) ha constituido la base del screening, diagnóstico y seguimiento del CaPr en las últimas décadas. Dicha determinación debe de ir siempre acompañada del examen anatomopatológico del tejido prostático biopsiado para poder establecer el diagnóstico definitivo. De cualquier modo, el cribado del CaPr en la población general mediante el uso del PSA es muy controvertido, ya que con frecuencia conduce al diagnóstico de tumores indolentes que obtienen escaso o nulo beneficio del tratamiento y en cambio no nos permite distinguir los tumores más agresivos y

letales. En consecuencia, muchos pacientes sufren los efectos secundarios del sobret ratamiento, mientras que otros reciben un tratamiento insuficiente^[5,6].

El aumento resultante en la incidencia de CaPr en estos estadios iniciales como consecuencia de los programas de cribado, así como la mejora en los tratamientos disponibles en la última década, ha contribuido a una disminución de la mortalidad asociada al CaPr^[7]. En el caso particular de España, y según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) proporcionados en diciembre de 2019, correspondientes al año 2018, el cáncer constituyó la segunda causa de muerte (26,4% de todos los fallecimientos), constituyendo en particular las muertes por CaPr el 5,2% del total de muertes por cáncer y el 2,7% respecto al total de enfermedades, constituyendo la primera causa de mortalidad en varones, con 5.841 defunciones, aunque supone una reducción del 1,6% respecto al año 2017 en el número de fallecimientos por CaPr^[8].

1.2 GRUPOS DE RIESGO Y TRATAMIENTO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Más de un 95% de los diagnósticos anatomopatológicos en CaPr corresponden al adenocarcinoma de próstata tipo acinar convencional, no obstante, existen otras variantes histológicas que pueden ser identificadas en la biopsia prostática^[9], algunas de ellas con importantes implicaciones pronósticas^[10,11].

La clasificación de los pacientes con CaPr en grupos pronósticos ha tenido en cuenta variables clínico-patológicas como el estadio clínico, determinado por el sistema de clasificación TNM (tumor-node-metastasis) adoptado por el American Joint Committee on Cancer^[12], el score Gleason de la biopsia prostática, utilizado para analizar el nivel histológico de diferenciación en base al grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento tumoral^[13] y los niveles de PSA pretratamiento, (Tabla 1).

INTRODUCCIÓN

Tx	No se puede valorar la existencia de tumor primario		
T0	No existe evidencia de tumor primario		
T1	Clínicamente no existe tumor palpable ni en pruebas de imagen		
T1a	Tumor histológico incidental en menos del 5% del tejido resecado		
T1b	Tumor histológico incidental en más del 5% del tejido resecado		
T1c	Tumor identificado en biopsia con aguja (por ejemplo debido a PSA elevado)		
T2	Tumor limitado a la próstata		
T2a	Afecta la mitad o un lóbulo o menos		
T2b	Afecta más de la mitad o un lóbulo, pero no los dos lóbulos		
T2c	Afecta a ambos lóbulos		
T3	El tumor se extiende a través de la cápsula prostática		
T3a	Extensión extracapsular (unilateral o bilateral)		
T3b	Invade las vesículas seminales		
T4	El tumor se fija o invade las estructuras adyacentes sin incluir las vesículas seminales, como el esfínter externo, recto, vejiga, músculos elevadores, y/o la pared pélvica.		
Nx	No se han valorado los ganglios linfáticos regionales	MO	Ausencia de metástasis
NO		M1	Metástasis a distancia
N1		Afectación de ganglios linfáticos regionales.	M1a
	M1b		Metástasis ósea/s
	M1c		Otra/s metástasis, con o sin metástasis óseas.

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM del CaPr adoptado por el American Joint Committee on Cancer.

T: tumor primario clínico. N: ganglios linfáticos regionales. Los ganglios linfáticos regionales incluyen: pélvicos, hipogástricos, obturadores, iliacos (internos, externos o inespecíficos) y sacros (laterales, presacros, del promontorio o inespecíficos). M: metástasis.

Respecto al grado de Gleason sus patrones varían desde bien diferenciado (grado 1) hasta indiferenciado (grado 5), presentando la mayoría de los tumores más de un patrón histológico y representando este sistema dicha heterogeneidad en base a la suma de puntuación de los dos patrones predominantes, el primario (más predominante) y el secundario (segundo más predominante), así mismo, la asignación del grado de Gleason se puede hacer sobre cada cilindro biopsiado o bien dando un grado de Gleason al conjunto de cilindros obtenidos. Por otra parte, a lo largo de los años, hemos asistido a una evolución en el sistema de gradación de Gleason, primero en 2005 y posteriormente en 2010 y 2014 con matices importantes que influyen en la puntuación final obtenida^[13-15].

En este contexto, cabe destacar por su utilización y relevancia los Grupos de riesgo de D'Amico y los Grupos de riesgo de la National Cancer Comprehensive Network (NCCN)^[16] ya que proporcionan una categorización más extensa.

Riesgo	TNM	PSA ng/ml	Gleason
Bajo	T1c-T2a	≤ 10	Gleason ≤ 6
Intermedio	T2b	> 10 a 20	Gleason 7
Alto	T2c	> 20	Gleason ≥ 8

Tabla 2. Grupos de riesgo de D'Amico en CaPr.

Sin embargo, en la práctica clínica se constata que el comportamiento de la enfermedad difiere entre pacientes incluidos dentro de un mismo grupo, ya que pacientes incluidos en un mismo grupo de riesgo pueden tener un comportamiento muy heterogéneo. El reconocimiento de estas limitaciones ha favorecido el desarrollo de normogramas y subclasificaciones^[17,18], con el objetivo de ajustar al máximo las diferentes opciones de tratamiento en base a la información disponible de la enfermedad.

1.3 TRATAMIENTO ENFERMEDAD LOCALIZADA CON INTENCIÓN CURATIVA

1.3.1 PROSTATECTOMÍA RADICAL

La prostatectomía radical es uno de los tratamientos de elección del CaPr localizado. Actualmente existen diferentes tipos de aproximaciones para su realización (vía transperineal, retropúbica, laparoscópica y robótica) ya que los continuos avances han permitido ampliar las diferentes opciones disponibles con la finalidad de seleccionar en cada caso el abordaje más adecuado.

Existen estudios prospectivos aleatorizados como el ensayo SPCG-4, que han demostrado un beneficio tanto en supervivencia global (SG) como en supervivencia cáncer específica (SCE), de la prostatectomía radical frente a una actitud conservadora en el tratamiento de pacientes de bajo riesgo y riesgo intermedio^[19]. Por otra parte, los datos del estudio PIVOT^[20], con un seguimiento de 10 años, no muestran una diferencia significativa en SCE entre prostatectomía

radical y observación, aunque en el análisis por subgrupos esa diferencia si es evidente para pacientes con un PSA>10ng/ml, Hazard Ratio (HR), 0,67; Intervalo de confianza (IC) 95% (0,48-0,94), sugiriendo que pacientes diagnosticados de CaPr de riesgo intermedio/alto riesgo podrían beneficiarse de este abordaje terapéutico. En cuanto a pacientes diagnosticados de CaPr de alto riesgo la prostatectomía radical es una opción terapéutica que ha de acompañarse de una linfadenectomía pélvica ampliada. La decisión de llevar a cabo una disección de las cadenas ganglionares debería guiarse por la probabilidad de metástasis linfática, que puede establecerse a partir de variables como el PSA basal, el estadio clínico y el grado de Gleason.

1.3.2 TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

El tratamiento radioterápico consiste en administrar una dosis terapéutica de radiación ionizante sobre el tumor y áreas afectas con la mayor precisión posible minimizando la dosis que reciben los tejidos sanos que lo rodean. Disponemos de varias modalidades de tratamiento, como la braquiterapia y la radioterapia externa (EBRT, del inglés external beam radiation therapy). Para la administración de EBRT se pueden utilizar desde técnicas sencillas como la radioterapia tridimensional convencional (RT-3D) hasta técnicas más avanzadas como la radioterapia de intensidad modulada (IMRT, del inglés intensity-modulated radiation therapy) que permite la obtención de complejas distribuciones de dosis, optimizando los resultados obtenidos con un perfil de toxicidad más bajo y alcanzando una mayor dosis de radiación sobre la enfermedad tumoral. Esta escalada de dosis ha demostrado un impacto significativo en la supervivencia libre de progresión bioquímica a los 5 años^[21], observándose así mismo un beneficio claro utilizando tratamiento hormonal concomitante de larga duración en pacientes con CaPr de alto riesgo^[22].

Por otra parte, la braquiterapia prostática puede ser administrada con Baja Tasa de Dosis (LDR), (mediante la implantación de semillas radioactivas permanentes), o con Alta Tasa de Dosis (HDR), (mediante la colocación temporal de catéteres en la glándula prostática para transportar una fuente de alta actividad de Ir-192 o Co-60 a la lesión tumoral). Ambas modalidades emplean la vía transperineal para la realización de una implantación guiada por ecografía transrectal permitiendo una rápida caída de dosis en función de la distancia a la

fuelle, como la fuente se suele insertar en la zona tumoral esta propiedad hace que los tejidos sanos que rodean al tumor reciban una dosis mínima, favoreciendo el perfil de toxicidad de este tratamiento respecto al administrado con radioterapia externa.

1.3.3 HT NEOADYUVANTE Y ADYUVANTE A LA RADIOTERAPIA

En 1941, los investigadores Huggins y Hodges demostraron por primera vez que mediante la orquiectomía o administrando un tratamiento con estrógenos se conseguía disminuir el volumen tumoral del CaPr y mejorar la sintomatología asociada a esta patología. Este importante hallazgo fue reconocido posteriormente con el premio Nobel de Fisiología. Desde ese momento, el primer tratamiento a administrar en pacientes con CaPr metastásico de nuevo diagnóstico ha sido la terapia de deprivación androgénica (TDA), bien con análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (leuprorelina, goserelina y/o triptorelina) o excepcionalmente con antagonistas de la LHRH^[23], si bien la reciente irrupción en el mercado de antagonistas orales de la LHRH como el relugolix puede cambiar este escenario en un futuro próximo^[24]. En este mismo sentido, múltiples estudios han demostrado que la adición de una supresión androgénica a largo plazo (agonistas de la LHRH +/- antiandrógenos) a la radioterapia en grupos de pacientes con enfermedad localizada de alto riesgo, permite retrasar la progresión de la enfermedad (es decir, la recurrencia loco-regional o la aparición de metástasis a distancia) prolongando la supervivencia^[25-28], posiblemente por la eliminación de microenfermedad oculta o por un efecto aditivo de inducción de apoptosis a nivel local por parte del tratamiento hormonal. Así lo manifiestan las principales guías clínicas internacionales, tanto de la NCCN como de la Asociación Europea de Urología (EAU) recomendando en pacientes con CaPr de alto riesgo el tratamiento radioterápico combinado con 2 o 3 años de TDA como una de las opciones de tratamiento para estos pacientes^[16,29]. No obstante, a pesar del uso de TDA en combinación con el tratamiento radioterápico, la progresión metastásica y la muerte relacionada con el CaPr ocurren con una frecuencia elevada en pacientes con enfermedad localizada de alto riesgo^[26], representando un problema clínico relevante.

1.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD AVANZADA

La vía del receptor androgénico (AR) es esencial para el desarrollo y el normal funcionamiento de la próstata y tiene además un papel crítico en la carcinogénesis y progresión de los tumores prostáticos^[30]. Por ello, el principal tratamiento sistémico contra el CaPr consiste en la TDA, ya sea mediante la inhibición de la producción de andrógenos o mediante la inhibición de su función sobre el AR con compuestos denominados antiandrógenos. Ambos compuestos resultan en la inhibición de la actividad transcripcional del AR, con una tasa de respuesta >90% en tumores que no han recibido estos tratamientos con anterioridad^[31]. En el contexto evolutivo del CaPr hemos de hacer una diferenciación clave, que condiciona los tratamientos indicados para cada una de las etapas, en función de la sensibilidad del tumor a la terapia hormonal convencional (hormonosensibilidad) o bien una situación de resistencia a la privación androgénica o castración.

A pesar de que la mayoría de los pacientes con CaPr metastásico hormonosensible, ya sea “*de novo*” o tras recurrencia metastásica, responden favorablemente al tratamiento con TDA^[32], en la mayoría de los casos la enfermedad se vuelve resistente a la castración antes de los 3 años^[33]. En los últimos años se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos con la finalidad de valorar el beneficio de la intensificación del tratamiento en estos pacientes. La opción de administrar de inicio quimioterapia con docetaxel junto a la TDA estándar ha sido valorada por tres estudios pivotaes que merecen ser referenciados el GETUG-15 francés^[34], el CHAARTED americano^[35] y el brazo C del STAMPEDE británico^[36] con resultados claramente favorables para el uso de docetaxel junto con TDA en pacientes con alto volumen tumoral según criterios CHAARTED (presencia de metástasis viscerales y/o ≥ 4 metástasis óseas de las que al menos 1 debe estar fuera del esqueleto axial o de la pelvis), siendo su uso algo más controvertido en el caso de los pacientes con enfermedad de bajo volumen^[29,37]. Por otro lado, la adición de diferentes fármacos inhibidores de la vía del AR (abiraterona, enzalutamida o apalutamida) causa una clara mejoría en el tiempo a la progresión de la enfermedad, la SG y la calidad de vida de estos pacientes^[38-41].

El desarrollo de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), que representa un estadio letal de la enfermedad, sucede en prácticamente todos los casos avanzados y tras un tiempo variable desde el inicio de la TDA. La mediana de supervivencia desde la resistencia a la

castración se sitúa entorno a los 60 meses en diferentes estudios^[42-44] siendo significativamente menor en los pacientes que debutan con enfermedad metastásica^[35,36].

La resistencia a la castración se define como la progresión de la enfermedad a pesar de que el paciente tenga unos niveles de testosterona en rango de castración^[29]. Se entiende como progresión la presencia de al menos una de las siguientes circunstancias:

- Progresión bioquímica: tres subidas consecutivas de PSA, con 1 semana de separación, dando como resultado dos aumentos del 50% sobre el PSA Nadir, con PSA >2 ng/ml.
- Progresión radiológica: aparición de nuevas lesiones, bien dos o más lesiones óseas nuevas en la gammagrafía ósea, o bien una nueva lesión de tejidos blandos valorable utilizando criterios RECIST 1.1.

En un porcentaje significativo de pacientes en los que se inicia TDA por recaída local o bioquímica tras tratamiento local, se observa resistencia a la castración sin que presenten evidencia de metástasis por pruebas convencionales (TAC y/o gammagrafía ósea). Actualmente disponemos de datos de 3 ensayos clínicos fase III, PROSPER (enzalutamida), ARAMIS (darolutamida) y SPARTAN (apalutamida) que han demostrado que la adición de un agente inhibidor de la vía del receptor de andrógenos a la TDA retrasa la aparición de metástasis y resulta en una mejora significativa de la SG que justificarían el uso de los llamados tratamientos hormonales de segunda generación en pacientes con CPRC con tiempo de duplicación de PSA (PSADT) ≤ 10 meses^[42-44]. El uso de técnicas de imagen de nueva generación, como el PET-PSMA, permite la identificación de la diseminación metastásica en pacientes en los que no se identifica enfermedad a distancia con las pruebas convencionales, mucho menos sensibles. En el momento actual, no está claro el beneficio del tratamiento radical de estas lesiones o de iniciar tratamiento sistémico basado únicamente en la presencia de enfermedad diseminada mediante pruebas de imagen de nueva generación.

En cuanto al tratamiento de los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm), en 1996, la adición de mitoxantrone al tratamiento estándar en aquel momento (análogo LHRH + prednisona 5mg/12h) demostró una mejora en la calidad de vida,

sin impacto en la SG^[45]. En 2004, dos estudios, TAX327^[46] y SWOG 99-16^[47], demostraron el beneficio en SG de añadir docetaxel frente al mejor tratamiento de soporte. Posteriormente abiraterona y enzalutamida demostraron un beneficio significativo en SG tanto antes como después de tratamiento con docetaxel, mejorando la calidad de vida en estos pacientes^[48-52]. En este sentido, tanto el uso de docetaxel como el de cabazitaxel sigue considerándose en estos momentos como una opción de tratamiento válida^{[53][54]}. En relación a los radiofármacos, el Radium 223 ha conseguido posicionarse como una opción de tratamiento en pacientes con CPRC con metástasis óseas sintomáticas en pacientes que no presentan metástasis viscerales mejorando la SG^[55]. A pesar de que no disponemos de datos firmes sobre la secuencia óptima de tratamiento en estos pacientes, el estudio CARD indica que la secuenciación de inhibidores de señalización del receptor de andrógenos (iSRA) es inferior al uso de quimioterapia tras progresión a un iSRA^[56] y el estudio FIRSTANA establece que cabazitaxel no es superior a docetaxel en primera línea, pero sí más tóxico^[57], por lo que se usa tras docetaxel en base a la evidencia publicada.

Recientemente, el estudio PROfound ha demostrado el beneficio de olaparib en pacientes con CPRCm con alteraciones en los genes implicados en los mecanismos de reparación del daño en el DNA (DDR), cuya enfermedad ha progresado tras tratamiento con abiraterona o enzalutamida^[58,59], representando el primer estudio aleatorizado fase III en CaPr avanzado guiado por un biomarcador con resultados y abriendo las puertas a un enfoque personalizado en el tratamiento del CaPr en base a la utilización de biomarcadores moleculares.

1.5 BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA Y TRASLACIÓN A LA MEDICINA PERSONALIZADA

Como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variabilidad en el pronóstico de los pacientes con CaPr, a pesar de los avances que se han producido en el diagnóstico y en el tratamiento de estos pacientes. En los últimos años, varios estudios que han delineado el panorama genético del CaPr mediante técnicas de secuenciación han demostrado la presencia de alteraciones en vías relevantes desde el punto de vista biológico y clínico^[60-63], permitiendo una mejor clasificación de los tumores en grupos pronósticos así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

En el caso del CaPr localizado, el análisis de secuenciación llevado a cabo por la Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), en 333 tumores primarios de próstata, identificó que hasta un 19% de los tumores analizados tenía aberraciones en la línea germinal o somática de los genes implicados en DDR, incluidos *BRCA2*, *BRCA1*, *CDK12*, *ATM*, *FANCD2* y *RAD51C*^[64].

Así mismo, el grupo International Stand Up to Cancer/Prostate Cancer Foundation/American Association of Cancer Research Prostate Cancer^[65] analizó las características moleculares presentes en las biopsias de lesiones metastásicas de 150 pacientes con CPRCm, observando que la mayoría de estos pacientes presentaban alteraciones sobre las que se podía actuar farmacológicamente, siendo la vía del AR la que se encontró más frecuentemente alterada (50-70%) y constituyendo las mutaciones y amplificaciones del AR, los eventos más frecuentes. La observación de que los genes regulados por AR están aún activos en pacientes con CPRC, a pesar de niveles indetectables de testosterona en sangre, ha promovido la identificación de los procesos que dirigen la actividad del AR en este ambiente de castración hormonal. Dichos mecanismos incluyen niveles elevados de andrógenos intratumorales en comparación con los niveles séricos, mutaciones activadoras del AR, así como la amplificación génica y el procesamiento alternativo del AR que hacen que el receptor esté constitutivamente activo^[30], no obstante, los mecanismos biológicos que rigen la progresión tumoral tras la activación del AR, así como aquellos que colaboran en el desarrollo de la resistencia a la castración no han sido todavía claramente establecidos. En casi la cuarta parte de los pacientes analizados por Robinson D et al. (23%) se identificaron alteraciones en los genes implicados DDR^[65], (Figura 1). Un hallazgo inesperado fue que aproximadamente la mitad de las alteraciones en los genes implicados DDR estaban ya presentes en la línea germinal. Se identificaron alteraciones en la vía de *PI3K/AKT/mTOR* en un 45% de los pacientes, siendo la pérdida de *PTEN* la alteración más frecuente.

Por otra parte, en aproximadamente el 25% de los pacientes se han observado alteraciones en genes reguladores del ciclo celular como *RB1* y diferentes quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La pérdida de *RB1* es frecuente en tumores clínicamente agresivos,

INTRODUCCIÓN

identificándose con una frecuencia elevada en tumores que han progresado a varias líneas de tratamiento^[66].

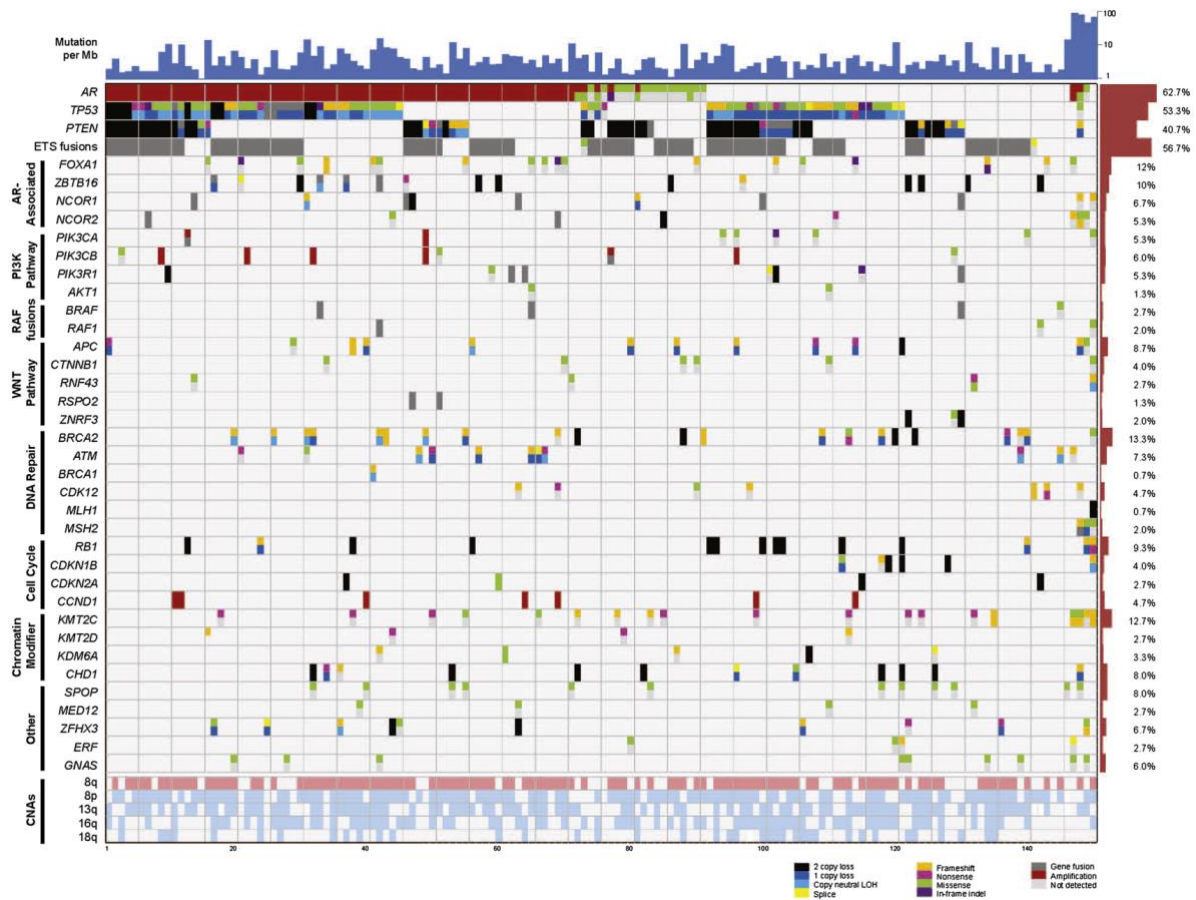


Figura 1. Análisis integral de las alteraciones somáticas y de la línea germinal en pacientes con CPRCm obtenido a través de técnicas de secuenciación. Robinson et al. Cell, 2015.

La comparación sistemática de tumores primarios y lesiones metastásicas para identificar qué eventos están asociados con la enfermedad avanzada puede resultar clave para analizar los efectos fenotípicos relativos a la oncogenicidad, el potencial metastásico y las características de las respuestas a los diferentes tratamientos disponibles. Un estudio reciente analizó muestras de 680 tumores primarios y de 333 lesiones metastásicas, incluidos los casos de los estudios mencionados anteriormente^[64,65], identificando defectos de la línea germinal y/o somática en estos genes en el 10% y el 27% de las muestras primarias y metastásicas, respectivamente, con aberraciones de *BRCA2* como el evento más recurrente^[63]. En muestras metastásicas entre los genes más frecuentemente mutados se incluyeron *TP53*, *AR*, *PTEN*, *RB1*, *FOXA1*, *APC* y *BRCA2*, analizándose también las alteraciones en los reguladores epigenéticos, incluyendo *KMT2C* y *KMT2D* como

predominantes en lesiones metastásicas, y en conjunto definiendo una firma genómica de enfermedad de alto riesgo. Por otra parte, las mutaciones en *SPOP* fueron significativamente más frecuentes en tumores primarios, así como las mutaciones *IDH1* y *ZMYM3* tras corregir las diferencias por la carga mutacional. En lo que respecta a las vías implicadas, en las muestras metastásicas fue significativamente más frecuente la alteración de la vía *PI3K*, las alteraciones en la vía de reparación del DNA, el ciclo celular, *WNT/CTNNB1* y los reguladores epigenéticos en comparación con los análisis sobre los tumores primarios^[63].

1.5.1 INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA

La inestabilidad genómica es considerada como una de las piedras angulares del desarrollo oncológico, siendo propuesta como uno de los mecanismos subyacentes en la iniciación y progresión del CaPr.

El mecanismo por el cual la inestabilidad genómica impulsa la progresión de la enfermedad se basa probablemente en el desarrollo de heterogeneidad intratumoral, con cambios estructurales que pueden conducir a la progresión de la enfermedad como resultado de un proceso evolutivo, en el cuál se seleccionan subclones celulares que tienen características agresivas (por ejemplo, la capacidad de formar depósitos metastásicos y de volverse resistentes a la castración). Estas variantes estructurales son frecuentes en el CaPr incluyendo deleciones, inserciones, duplicaciones en tándem, reordenamientos y translocaciones inter-cromosómicas. Los genes que codifican las proteínas que identifican el daño en el genoma y que se encargan de repararlo, interactúan con los responsables del control del ciclo celular, con el objetivo de frenar la replicación y división celular hasta que las lesiones hayan sido reparadas. En caso de no conseguirse se induce la apoptosis celular evitando la transmisión del error a las células hijas. Estos sistemas de reparación consiguen que menos de 1/1000 alteraciones accidentales se transformen en una mutación que se transmita a las células hijas^[67], por otro lado cuando estos mecanismos fallan y el daño permanece sin que la célula muera, lo transmitirá, pudiendo iniciarse la transformación tumoral^[68]. Concretamente en CaPr, la señal mediada por el AR se ha implicado en la adquisición de rupturas de doble cadena del DNA^[69] y patrones de inestabilidad específicos.

Por otra parte, los errores espontáneos durante la replicación del material genético, así como la acción de múltiples condicionantes ambientales o incluso del medio intracelular puede dar lugar a lesiones en el DNA, para evitarlo, existen cuatro mecanismos principales de reparación del DNA: Mismatch Repair, reparación por escisión de bases, reparación de rupturas de doble cadena, y reparación por escisión de nucleótidos. En su conjunto son más de 130 los genes implicados en estos procesos, en los que se han identificado un gran número de polimorfismos, muchos de ellos con implicaciones funcionales^[70].

La **reparación por escisión de bases (BER)** es el mecanismo de reparación que elimina las modificaciones sutiles del DNA, eliminando bases nitrogenadas modificadas o añadidas erróneamente y producidas como consecuencia del correcto funcionamiento del metabolismo celular que puede generar especies reactivas de oxígeno (radicales hidroxilo, aniones superóxido, y peróxido de hidrógeno), derivados de la respiración oxidativa y de la peroxidación de los lípidos, además de la ruptura espontánea de algunas uniones^[71].

La **reparación por escisión de nucleótidos (NER)** elimina el daño del DNA que provocan las alteraciones que distorsionan la estructura de doble hélice e interfieren en la unión normal de las bases, alterando y bloqueando la replicación y la transcripción^[68]. La NER es el principal mecanismo para reparar estos daños, no solo los dímeros de pirimidinas inducidos por la radiación ultravioleta, sino también aductos de DNA debidos a tratamientos quimioterápicos como el cisplatino. Se distinguen dos vías de NER, según el mecanismo de reconocimiento de la lesión: GG-NER (Global Genomic Repair) reconoce lesiones que distorsionan la doble hélice a lo largo de todo el genoma y TCR-NER (Transcription Coupled Repair) actúa únicamente en las regiones transcripcionalmente activas cuando existe una lesión que bloquea la actividad de la RNA polimerasa II.

Mismatch Repair (MMR) es un sistema de reparación de DNA en el que intervienen una docena de genes que participan en la corrección de emparejamientos que se producen de forma errónea durante el proceso de replicación del DNA, favoreciendo el bloqueo de la recombinación entre secuencias similares, pero no idénticas, así como verificando los puntos de control del ciclo celular y participando en la muerte celular programada en respuesta a daños puntuales en el DNA^[72]. Los defectos en este sistema producen un aumento de la inestabilidad de todo el genoma, incluyendo unas regiones altamente repetitivas

denominadas microsatélites, lo que puede asociarse con el desarrollo de tumores tanto hereditarios como esporádicos^[73].

Reparación de lesiones de doble cadena (DSBR): Este tipo de lesiones son de las más letales a nivel celular. Este mecanismo de reparación dispone de dos sistemas para reparar estas lesiones: a través de uniones no homólogas (NHEJ, Non-homologous end joining) o mediante recombinación homóloga (RH, homologous repair) de una manera competitiva dependiente de la fase del ciclo celular^[74]. De hecho, la elección del mecanismo de reparación más adecuado por parte de la célula está condicionado a la fase del ciclo celular en que se encuentre, pero también al manejo inicial de la ruptura de doble cadena (DSB)^[75].

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (RH)

La RH es el mecanismo más fidedigno que poseen las células eucariotas para reparar las DSB del DNA. Requiere una secuencia de DNA homólogo como molde, generalmente la cromátida hermana, para alinear y reparar adecuadamente los extremos rotos, por lo que solo puede llevarse a cabo tras la replicación del DNA, en las fases S y G2 del ciclo celular^[76]. Además de ser una forma de reparación de las DSB, es esencial durante la meiosis, ya que es el mecanismo a través del cual se produce el intercambio de información entre las dos cromátidas^[77].

El primer paso en la reparación del daño sobre el DNA consiste en reconocer las áreas dañadas y transmitir la señal a los efectores. La histona H2AX juega un papel clave en la detección de daños ya que su fosforilación en el residuo de serina 139 permite formar la γ H2AX que actúa como sensor y sello distintivo de la respuesta celular a las DSB^[78].

Tras la ruptura de la cromatina, un gran número de moléculas γ H2AX se concentran alrededor de los sitios de DSB atrayendo proteínas de reparación de DNA^[79]. La señal de daño también puede amplificarse por fosforilación de H2AX por miembros de la familia de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PIKK), como ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) y/o *ATM-Rad3* (*ATR*)^[80]. *ATM* y *ATR* son fundamentales para la respuesta al daño del DNA, transmitiendo la señal mediante la fosforilación de proteínas involucradas en la detención del ciclo celular (a través de *CHK2* y *CHK1*) y la reparación del DNA (a través de RH) o la apoptosis (a través de *TP53*)^[81,82]. *BRCA1* se activa por *ATM*, *ATR* y *CHK2*, regulándose la progresión del ciclo celular, la ubiquitinación, la regulación transcripcional y finalmente la fidelidad en la reparación del

DNA. *BRCA1* se asocia con *PALB2* que conecta a *BRCA1* con *BRCA2*^[83], este complejo juega un papel crítico en la función de la recombinasa *RAD51*, aunque se desconoce la naturaleza de la interacción entre *BRCA1* y *RAD51*.

El proceso de RH comienza con la adhesión de varias proteínas (complejo *MRN* formado por la asociación *MRE11*, *RAD50* y *NBS1*) a los extremos de la cadena de DNA. *MRN* no solo establece múltiples contactos con *ATM*, sino que también controla y estimula su actividad y al mismo tiempo mantiene juntas las dos cadenas de DNA rotas^[84]. La recombinasa *RAD51* facilita en ese momento la unión entre las moléculas de DNA homólogas, regulándose dicha acción por su interacción con *BRCA2* (dependiente de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas ya que la fosforilación del residuo de serina 3291 puede resultar determinante)^[85] y siendo catalizada por diversas proteínas, como *XRCC2*, *XRCC3*, así como varias isoformas de *RAD51* (*RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* y *RAD52*), con la capacidad de hallar secuencias homólogas en todo el genoma y catalizar reacciones de intercambio, formando un anillo en la cadena de DNA.

Tras la realización del intercambio de información, gracias a la acción de una DNA polimerasa se produce el alargamiento del extremo 3' de la cadena invasora. Posteriormente en función del número de cadenas rotas se sigue el proceso de SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) o bien de DSBR (Double Strand Break Repair), en este último caso se produce la formación de dos anillos, uniéndose ambas cadenas rotas al molde y originándose las estructuras denominadas Holliday Junctions, sobre las que actúan endonucleasas específicas. Si el intercambio de información entre regiones homólogas del genoma es recíproco, se denomina entrecruzamiento (crossover), mientras que cuando no existe esta reciprocidad se denomina conversión génica (non crossover), produciéndose en algunas ocasiones ambos fenómenos^[86].

La falta de este mecanismo obliga a las células a solventar el daño genético mediante otros mecanismos más inexactos como la recombinación no homóloga (NHEJ) y que, por lo tanto, se tienda a incluir errores en la cadena de DNA reparada, lo que resulta en inestabilidad genómica^[87]. El déficit de RH que sucede en las células con mutaciones patogénicas en *BRCA1* y/o *BRCA2* es un paradigma de inestabilidad genómica y los individuos portadores de

mutaciones en estos genes tienen un riesgo incrementado de padecer diferentes tipos de cáncer, incluyendo tumores de mama, ovario y próstata^[88].

RECOMBINACIÓN NO HOMÓLOGA (NHEJ)

La reparación mediante NHEJ es mucho más rápida, pero como comentábamos anteriormente introduce errores, que con frecuencia resultan en cambios menores en la secuencia de DNA o en ocasiones puede promover reordenamientos cromosómicos graves^[89], ya que al perderse la secuencia del lugar donde asientan las DSB y la unión de extremos de secuencias situadas en dos cromosomas diferentes, se pueden originar translocaciones^[86]. Se trata de un mecanismo activo durante todo el ciclo celular^[90,91], pero fundamentalmente durante la fase G1, cuando no existe un cromosoma homólogo para que se produzca la recombinación^[75].

La respuesta de NHEJ se inicia, después del daño en el DNA, mediante el reconocimiento de DSB por el heterodímero Ku, formado por las subunidades Ku70 y Ku80^[92]. Ku muestra una alta afinidad por los extremos de las cadenas de DNA y se une al sitio donde se ha producido el daño del DNA, formando el heterodímero una proteína en forma de anillo que se desliza sobre los extremos de las hebras rotas y sirve como un andamio para reclutar otros componentes de la vía NHEJ^[93]. La proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) se recluta rápidamente en el complejo DNA-Ku, lo que provoca cambio conformacional del heterodímero Ku que hace que los extremos del DNA sean accesibles para las proteínas que intervienen posteriormente^[94]. Una vez unidos, la DNA-PK sufre trans y autofosforilación de varios residuos que inducen su actividad catalítica. Posteriormente, los extremos rotos del DNA son procesados por la nucleasa Artemis. El paso final en el mecanismo de reparación de NHEJ es la ligadura, mediada por la DNA ligasa IV, una ligasa flexible que puede ligar extremos de DNA incompatibles^[95]. Aunque el papel de la DNA-PK no está claramente establecido, se considera que tiene un papel relevante en la respuesta al daño del DNA y en el proceso de NHEJ. Goodwin et al. demostraron que la actividad del AR, es inducida parcialmente por el daño del DNA y que dicha actividad promueve la expresión y activación de un programa de expresión génica que rige la reparación del DNA, demostrando que la DNA-PK potencia la función del AR e identificando un circuito AR-DNA-PK como un importante efector de la reparación del DNA y la resistencia terapéutica en CaPr^[96]. Trabajos posteriores argumentan que la DNA-PK podría funcionar como un modulador selectivo de las redes transcripcionales

que inducen la migración celular, la invasión y la metástasis. Por consiguiente, la supresión de la DNA-PK podría inhibir el desarrollo de metástasis tumorales, así mismo se han encontrado en tumores avanzados, niveles elevados de DNA-PK, independientemente de los indicadores de daño del DNA. Combinados, estos hallazgos revelan funciones inesperadas de la DNA-PK, e identifican la DNA-PK como un potente impulsor de progresión tumoral y el desarrollo de metástasis en CaPr^[97].

1.5.2 ALTERACIONES EN LAS VÍAS DE REPARACIÓN DEL DNA

La serie más larga de muestras de CaPr en las que se ha analizado la presencia de alteraciones en genes implicados en la RH proviene del estudio PROfound^[58]. El 28% de las 2792 muestras analizadas con éxito presentaban alteraciones en alguno de los 15 genes analizados (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* y *RAD54L*). Este estudio confirma las alteraciones en *BRCA2* como el evento más frecuente (8,7%), seguido de las alteraciones en *CDK12* (6,3%) y *ATM* (5,9%). Por otro lado, en una serie con 1033 pacientes, Abida et al. identificaron defectos en la vía de MMR en un 3,1% de los casos, afectando en su mayoría a *MSH2*^[98].

Es importante destacar que la mayoría de los estudios que han analizado la presencia de defectos en genes implicados en DDR en tumores prostáticos, no distinguen el origen somático o germinal de dichas alteraciones^[99]. Un análisis reciente de más de 17.000 tumores en el que se incluyeron 1042 tumores de próstata, concluyó que a diferencia de lo que se observa en otros tipos de cáncer, aproximadamente la mitad de las alteraciones de *BRCA2* identificadas en tumores prostáticos están también presentes en la vía germinal^[100]. En cambio, la proporción germinal:somático es significativamente inferior para otras alteraciones, como son las que afectan a los genes implicados en la vía de MMR. Menos de un cuarto (22%) de las alteraciones MMR identificadas en los tumores de próstata están presentes en línea germinal^[98].

En el estudio PROfound, no se observó una diferencia significativa en la prevalencia de las alteraciones en genes implicados en DDR entre el tumor primario y las biopsias metastásicas,

INTRODUCCIÓN

lo que sugiere que la mayoría de estas alteraciones son eventos tempranos^[58], presentando resultados similares a los reportados por otros estudios^[98,101].

BRCA2 es el gen implicado en los mecanismos de DDR más frecuentemente alterado en CaPr tanto a nivel germinal como somático. Se sitúa en la región 13q13.1, de unos 84 Kb de longitud, y consta de 27 exones^[102]. La traducción de este gen da lugar a una proteína de 3418 aminoácidos que se localiza en el núcleo y esta involucrada en el mantenimiento de la integridad genómica^[103], así como en los procesos relacionados con el remodelamiento de la cromatina mediante RH.

Respecto a su estructura, en el extremo carboxilo (C-terminal) identificamos un dominio de unión al DNA, que se compone de un dominio helicoidal y tres pliegues OB, incluyendo una región que interactúa con el polipéptido DSS1, (interacción que incrementa la estabilidad de *BRCA2*) así como un segundo dominio importante que interactúa selectivamente con oligómeros *RAD51* y filamentos de nucleoproteína *RAD51*, proteína esencial para la RH y la reparación del DNA. *RAD51* interactúa directamente con una región del extremo carboxilo de *BRCA2* que no tiene homología con las repeticiones *BRC*. La fosforilación de esta región en Ser3291 por la quinasa dependiente de ciclina interrumpe la interacción *BRCA2-RAD51* C-terminal^[85]. El nivel de fosforilación en este residuo es bajo durante la fase S, cuando la actividad de *RAD51* es alta y aumenta a medida que la célula entra en la mitosis. El daño en el DNA provoca un bloqueo de esta fosforilación, lo que sugiere que esta modificación puede modular la actividad de *BRCA2*^[104]. La región de unión de *PALB2* se encuentra en el extremo amino terminal, *PALB2* facilita la localización de *BRCA2* y la acción de *RAD51* en el sitio del daño^[105]. En el centro encontramos el dominio *BCR*, formado por ocho repeticiones de una secuencia de 30 a 80 aminoácidos (repeticiones *BRC*) en el exón 11 del gen^[103,106,107], (Figura 2).

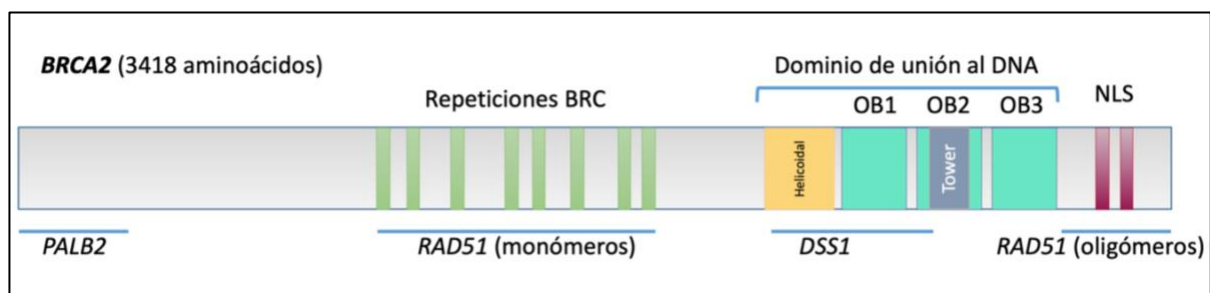


Figura 2. Diagrama de la estructura del gen *BRCA2*.

INTRODUCCIÓN

BRCA2 juega un doble papel en la regulación de las acciones de *RAD51*, Por una parte, las interacciones entre *RAD51* y las regiones *BRC3* o *BRC4* de *BRCA2* bloquean la formación de filamentos de nucleoproteína por *RAD51*. En segundo lugar, el transporte de *RAD51* al núcleo es defectuoso en las células con alteraciones en *BRCA2*. Por lo tanto, *BRCA2* regula tanto la localización intracelular como la capacidad de unión al DNA de *RAD51*. La pérdida de estos controles después de la inactivación de *BRCA2* puede ser un evento clave que conduce a la inestabilidad genómica y la tumorigénesis^[108].

De hecho, se han identificado fenómenos de inestabilidad genómica asociados a la pérdida de función de *BRCA2*. Los mecanismos de inactivación de *BRCA2* incluyen la línea germinal o mutaciones somáticas con pérdida del segundo alelo, pequeñas inserciones o deleciones homocigóticas que provocan un cambio en la pauta de lectura, provocando la aparición de un codón de parada prematuro, cuya consecuencia es el truncamiento de la proteína y por lo tanto la pérdida de función y reordenamientos que introducen puntos de ruptura dentro de *BRCA2* o mutaciones no sinónimas, que son aquellas en las que se produce un cambio de nucleótidos que conduce a un cambio de aminoácidos en la proteína^[100,109]. A diferencia de lo que sucede en otros tumores en los que las mutaciones germinales de *BRCA2* son más frecuentes que las somáticas, en CaPr la prevalencia es similar. El CaPr es el único tipo tumoral en el que la pérdida bialélica sucede con igual frecuencia en los pacientes con mutaciones germinales y en los que tienen alteraciones somáticas^[100], (Figura 3).

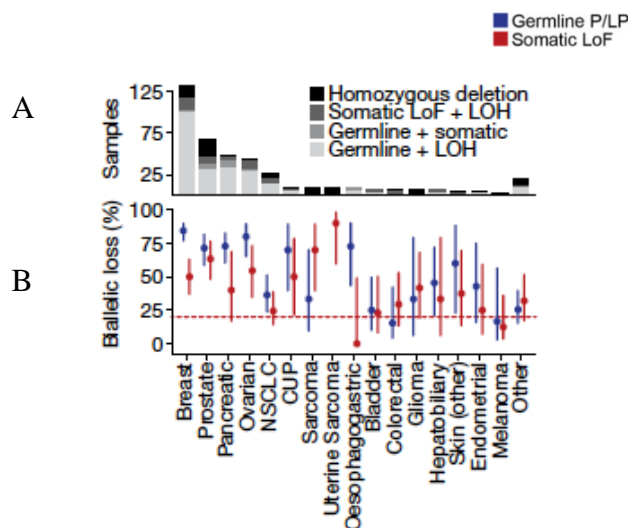


Figura 3. Inactivación bialélica por tipo tumoral y mecanismo de la misma (A) y por origen de la mutación (B). Adaptación de Jonsson et al. Nature, 2019.

1.5.3 MUTACIONES GEMINALES EN GENES IMPLICADOS EN DDR

Disponemos de datos que nos indican que hasta el 57% de la variación interindividual en el riesgo de padecer CaPr se ha atribuido a factores genéticos, lo que convierte al CaPr en uno de los tumores sólidos más heredables^[110]. Múltiples estudios han demostrado que esta agregación no se debe a factores asociados al estilo de vida, sino que más de la mitad del riesgo interindividual de desarrollar la enfermedad tiene su causa en factores genéticos^[110,111]. Existe una asociación reconocida entre el cáncer de mama y el CaPr^[112], dado que es frecuente que ambas patologías coincidan en una misma familia, lo que no se explicaría solo por la alta incidencia y prevalencia de estos tipos tumorales^[113]. La implicación de *BRCA1* y *BRCA2* se ha estudiado ampliamente, dado que las familias que portan mutaciones en estos genes muestran un incremento del número de tumores en ambos, hombres y mujeres. Estos genes, se han asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama, ovario, trompas de Falopio y peritoneo en mujeres, así como a cáncer de mama y de próstata en varones.

Las mutaciones germinales en *BRCA2* son el evento genético asociado a mayor riesgo de CaPr identificado hasta el momento. Las mutaciones patogénicas en *BRCA2* se han asociado con un riesgo de CaPr a lo largo de la vida del 55% (IC 95% 43-78%) y aquellas que afectan a *BRCA1*, con un riesgo absoluto de CaPr del 26% (IC 95% 15-43%)^[114]. Considerando que el riesgo en la población general de desarrollar CaPr es del 12%, las mutaciones germinales en *BRCA2* y *BRCA1* multiplicarían respectivamente por cinco y por dos la probabilidad de tener un CaPr^[114]. Mutaciones en genes asociados a otros síndromes de predisposición al cáncer, como *MSH2*, *ATM*, o *PALB2* entre otros, se han asociado también a un incremento del riesgo de padecer CaPr^[115], siendo en todos los casos ese riesgo muy inferior al atribuido a las mutaciones en *BRCA2*.

Como se ha mencionado anteriormente, La caracterización molecular del CaPr avanzado llevada a cabo por el grupo del International Stand Up to Cancer/Prostate Cancer Foundation, puso de manifiesto que un 23% de los tumores presentan alteraciones en genes implicados en DDR y que aproximadamente la mitad de dichas alteraciones están presentes en la línea germinal^[65]. La confirmación de estos resultados la ofreció un estudio multicéntrico de 692

pacientes con CaPr metastásico que reveló que el 12% de estos pacientes son portadores de una mutación patogénica en genes implicados en DDR asociados a síndromes de predisposición al cáncer^[116]. Una frecuencia algo menor de mutaciones en los mismos genes (7,4%) se observó en el estudio PROREPAIR-B^[33], que realizó el cribado genético de 419 pacientes con CPRCm en España. La variación en prevalencia observada entre estos dos estudios está en relación al diferente background genético de las poblaciones incluidas, ya que la serie de Pritchard et al.^[116] tenía una prevalencia significativa de las mutaciones fundacionales Ashkenazi (*BRCA1 c.5266dupC*, *BRCA2 c.5946delT* y *CHEK2 p.1100del*). En cualquier caso, *BRCA2* fue el gen más frecuentemente alterado en ambas series (5,3%^[116] y 3.3%^[33], respectivamente). Otros genes asociados a síndromes de predisposición al cáncer mutados en línea germinal con una frecuencia >1% son *ATM*, *CHEK2*, *MSH2* o *BRCA1*^[33,116,117]. Dependiendo de cual sea el gen alterado, el paciente puede tener un riesgo aumentado de diferentes tipos de cáncer incluyendo colon, páncreas o melanoma, entre otros. Cada uno de sus hijos tiene el 50% de probabilidad de heredar la alteración, que puede estar también presente en sus hermanos u otros familiares. Este mismo gen se asocia a un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama y/o ovario en mujeres. La identificación temprana de estas mutaciones en las familias permite incluir a los individuos portadores en programas de prevención y de diagnóstico precoz de los diferentes tumores.

Otro motivo para buscar de forma activa la presencia de mutaciones germinales en los pacientes con CaPr, es que algunas de ellas tienen implicaciones pronósticas. El hecho de que esta prevalencia en mutaciones de la línea germinal fuera significativamente mayor que el 5% identificado en hombres con enfermedad localizada y el 3% identificado en la población general sugiere que tales eventos pueden predisponer a formas agresivas de la enfermedad^[116], (Tabla 1). Concretamente, las mutaciones germinales en *BRCA2* se han asociado con un curso evolutivo más agresivo de la enfermedad, así como con resultados clínicos adversos respecto a los pacientes no portadores de dichas mutaciones^[33,118–122].

INTRODUCCIÓN

Referencia	Población n	Características de los pacientes	Genes DNA-Repair	Mutaciones Germinales DNA-Repair n (%)	Mutaciones Germinales BRCA2 n (%)
TCGA Prostate Cancer	333	CaPr localizado / localmente avanzado	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CDK12, FANCD2, RAD51C*</i>	23 (4,6)	6 (1,2)
Leongamornlert et al.	191	Historia familiar de CaPr	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, MLH1, MLH3, MRE11, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS1, PMS2, RAD50, RAD51C, STK11</i>	14 (7,3)	4 (2,0)
Nicolisi et al.	3607	Población no seleccionada	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, EPCAM, HOXB13, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PMS2, TP53, RAD51D, PALB2</i>	620 (17,2)	170 (4,74)
Pritchard et al.	692	Cáncer de próstata metastásico	<i>ATM, ATR, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, FAM175A, GEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, XRCC2</i>	82 (11,8)	37 (5,3)
Robinson et al.	150	CPRCm	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, FANCA, RAD51B, RAD51C, MLH1, MSH2*</i>	12 (8,0)	8 (5,3)
Annala et al.	319	CPRCm	<i>ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CDK12, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, RAD51B, RAD51C</i>	22 (6,9)	16 (5,0)
Castro et al.	419	CPRCm	<i>APEX1-2, APLF, ATM, ATR, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK7, CDK12, CHEK1, CHEK2, DCLRE1C, DDB1, DMC1, EME1-2, EPCAM, ERCC1-6, ERCC8, FAAP20, FAAP24, FAM175B, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, GEN1, GTF2H1-5, KIAA0415, LIG4, MBD4, MLH1, MLH3, MMS19, MNAT1, MPG, MRE11A, MSH2-6, MUS81, MUTYH, NBN, NEIL1-3, NHEJ1, NTHL1, OGG1, PALB2, PARP1-3, PMS1-2, PNKP, PRKDC, RAD9A, RAD17, RAD23A-B, RAD50-51, RAD52, RAD54B, RAD54L, RBBP8, RPA1-3, SLX1A, SLX1B, SLX4, SMUG1, TDG, UNG, XAB2, XPA, XPC, XRCC1-6</i>	38 (9,1)	14 (3,3)
Antonarakis et al.	172	CPRCm	<i>ATM, ATR, BAP1, BARD1, BLM, BRAP, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK12, CENPQ, CHEK1-2, EPCAM1, ERCC1-6, FAM175A, FAM175B, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, GEN1, HDAC2, MLH1, MLH3, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PIF1, PMS2, RAD51, RAD54L, RDM1, TP53, XRCC2</i>	22 (12,0)	5 (2,9)

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Prevalencia de mutaciones germinales en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA en los estudios publicados.

Abreviaturas: CaPr, cáncer de próstata; DNA-Repair, genes involucrados en los mecanismos de reparación del DNA; CPRCm, cáncer de próstata resistente a la castración metastásico; * Genes de reparación del DNA positivos para mutaciones en la línea germinal en el análisis final.

En cuanto al tratamiento del CaPr localizado en pacientes portadores de mutaciones germinales, todos los datos disponibles provienen de series retrospectivas que han analizado principalmente el impacto de *BRCA2*. Carter et al. analizaron los resultados de 1211 hombres sometidos a un protocolo de vigilancia activa, determinando la presencia de mutaciones germinales en *BRCA1*, *BRCA2* y *ATM*, en dicho estudio se demostró que los pacientes portadores de mutaciones en *BRCA2* eran más propensos a presentar una reclasificación del grado de Gleason en las biopsias seriadas a las que eran sometidos, como parte del protocolo de vigilancia activa, en comparación con los no portadores, requiriendo por tanto un tratamiento activo^[123]. Estos resultados sugieren que la vigilancia activa puede no ser una buena opción terapéutica para pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* a pesar de que las demás características clínico-patológicas de la enfermedad indiquen que es un tumor de bajo riesgo. Del mismo modo, no disponemos de datos concluyentes en cuanto al uso potencial de las mutaciones germinales en *BRCA2* o en otros genes implicados en DDR para seleccionar tratamientos con intención curativa. La única evidencia disponible hasta la fecha procede de un estudio retrospectivo que analizó el pronóstico de 1302 pacientes, incluyendo 18 y 49 pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2*, respectivamente. Los portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* presentaron recurrencia metastásica con mayor frecuencia y de forma más temprana que los no portadores. Entre los pacientes tratados con cirugía, el 89% y 67% de los portadores y el 97% y 91% de los no portadores estaban libres de metástasis a los 5 y 10 años respectivamente. La diferencia fue aún mayor para los pacientes tratados con radioterapia ya que solamente el 57% y 39% de los portadores de mutaciones en *BRCA* estaban libres de metástasis a los 5 y 10 años comparado con el 91% y 80% de los no portadores. La comparación directa de ambos grupos no fue posible, dado que los pacientes tratados quirúrgicamente tenían características clínico-patológicas más favorables que los que recibieron radioterapia^[122]. Hasta que no se conozcan los resultados finales del estudio prospectivo IMPACT^[124], no será posible conocer cual es la opción terapéutica más adecuada para estos pacientes.

El único estudio prospectivo llevado a cabo en el escenario del CPRCm, el estudio PROREPAIR-B, ha mostrado que los pacientes con mutaciones heredadas en genes implicados en DDR, particularmente en *BRCA2*, pueden responder a las terapias disponibles en este escenario clínico, pero tienden a progresar más rápidamente a dichos tratamientos que los pacientes no portadores, traduciéndose en un recorte de la supervivencia^[33].

De todos estos estudios se concluye la necesidad de monitorizar de forma estrecha el tratamiento de los pacientes con mutaciones heredadas en *BRCA2*. En relación a otros genes implicados en DDR, no se dispone de evidencia suficiente para conocer su impacto debido a que el número de pacientes con estas alteraciones incluidos en los diferentes estudios publicados hasta la fecha fue pequeño.

Por otra parte, las mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2*, predicen respuesta a los tratamientos con inhibidores de *PARP*^[99]. La utilización de estos inhibidores es una estrategia para tratar los tumores deficientes en la reparación del DNA a través del mecanismo de letalidad sintética (Figura 4). En estos momentos parece que de entre todas las alteraciones en la vía DDR, aquellas que afectan a *BRCA2* son las que se asocian a un mayor beneficio del tratamiento con estos fármacos^[99].

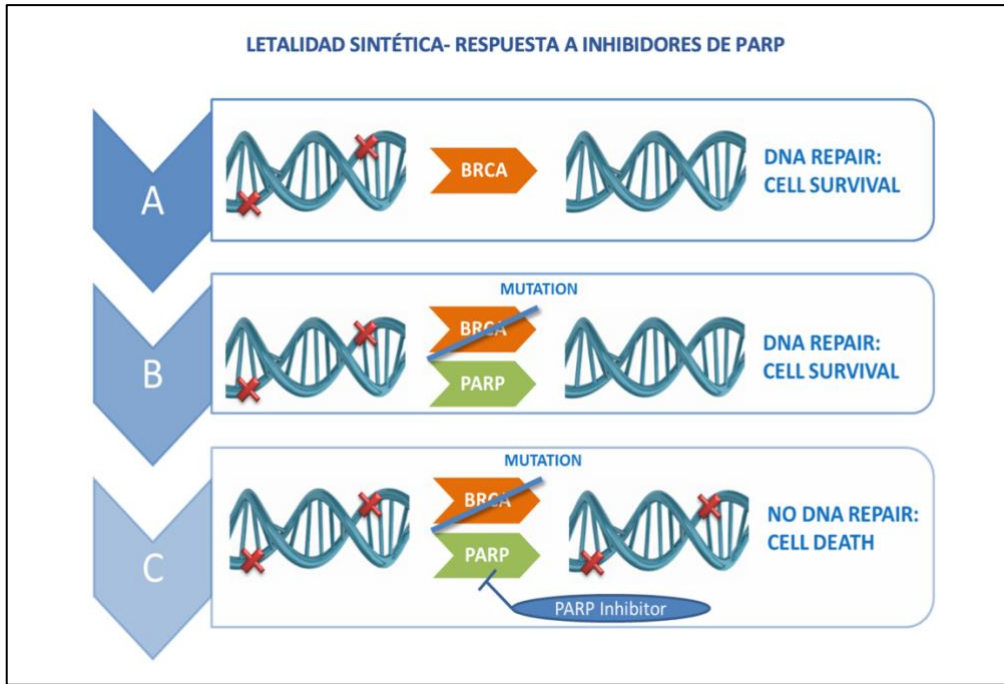


Figura 4. Modelo de letalidad sintética en respuesta a inhibidores de *PARP*.

A: En las células sanas, tras producirse un daño sobre el DNA, actúan los mecanismos de reparación correspondientes. B: Las células con mutaciones de *BRCA* se vuelven dependientes de la vía *PARP* para reparar los daños en el DNA. C: Las células expuestas a los inhibidores de *PARP* reparan el DNA a través de los productos proteicos codificados por los genes *BRCA*. En las células con mutaciones de *BRCA* que se tratan con inhibidores de *PARP*, ambos mecanismos de reparación del DNA se bloquean y la célula muere.

En base a lo expuesto anteriormente, en estos momentos, la mayoría de las sociedades científicas y los comités de expertos recomiendan el estudio de mutaciones germinales en los pacientes con CaPr avanzado. Tradicionalmente, el estudio genético se iniciaba por la existencia de una historia familiar de cáncer que hiciese sospechar un síndrome de cáncer hereditario. Sin embargo, se ha observado que más de un tercio de los pacientes con CaPr en los que se ha identificado una alteración germinal carecen de antecedentes familiares o no saben de ellos^[33,117] y por lo tanto no cumplían los criterios clásicos para realizar un estudio genético. Esto, junto con que hasta la fecha no ha sido posible establecer ninguna característica clínico-patológica que permita identificar a los portadores y optimizar el cribado y la prevalencia relativamente alta (10%) de estas alteraciones en los pacientes con CaPr metastásico, han llevado a la recomendación reflejada en las diferentes guías internacionales de práctica clínica^[37], de ofrecer estudio genético a todos estos pacientes con CaPr avanzado. La segunda conferencia del Consenso de Filadelfia ofrece unas recomendaciones y pautas claras para el estudio genético en CaPr^[125]. Estos expertos recomiendan que dicho estudio se ofrezca a pacientes con enfermedad metastásica tanto hormonosensible como resistente a la

castración. Debería considerarse el uso de un panel genético amplio que incluya genes asociados a síndromes de predisposición al cáncer que incluyan el CaPr. Si esto no fuese posible, deberían estudiarse al menos *BRCA1* y *BRCA2* y considerar otros genes en función de la historia familiar del paciente. Así mismo, debería investigarse el posible origen germinal de las alteraciones genéticas identificadas en el tumor que afecten a genes de predisposición al cáncer. Los expertos recomiendan también la realización de estudio genético en los pacientes con CaPr no metastásico que presenten algunas de las siguientes características: origen judío Ashkenazi, enfermedad avanzada, Gleason ≥ 8 , e histología intraductal/ductal, si bien esto último es controvertido y algunos estudios no sustentan esta recomendación^[126]. En estos pacientes debería analizarse siempre *BRCA2* y considerar otros genes en función de la historia familiar o personal de cáncer. Finalmente, en aquellos hombres no diagnosticados que presenten una historia familiar de CaPr (consistente en un familiar de primer grado o al menos dos de segundo grado diagnosticados con una edad inferior a 60 años o que hayan desarrollado CaPr metastásico) se debería analizar la presencia de mutaciones en *BRCA2* y *HOXB13* y considerar añadir otros genes en función de la historia familiar y personal.

1.5.4 OTROS MARCADORES GENÓMICOS CON POSIBLE UTILIDAD PRONÓSTICA

Los avances en el conocimiento de la biología de la enfermedad están permitiendo la identificación de nuevos biomarcadores en diferentes etapas del curso evolutivo de la enfermedad, muchos de los cuales, precisan todavía de validación antes de poder incorporarse a la práctica clínica habitual. En este contexto se ha identificado la presencia de una serie de eventos moleculares previamente asociados a mal pronóstico que ocurrirían en los tumores *BRCA* con mayor frecuencia que en los esporádicos de grado de Gleason y estadio similares^[127], de hecho, el CaPr asociado a *BRCA2*, no tratado previamente con hormonas, alberga un perfil mutacional que se asemeja más al CPrCm que a la enfermedad localizada esporádica^[64,65,128]: tal es el caso de la inestabilidad genómica observada no solo en el tumor sino también en el tejido prostático sano de los portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*, la alta frecuencia del reordenamiento *TMPRSS2-ERG*, la amplificación de *ERG* y/o de *MYC*, la pérdida de *PTEN* y/o del gen de retinoblastoma o la pérdida de heterocigosidad en *BRCA2*.

1.5.4.1 RB1

RB1 es un gen supresor tumoral de gran tamaño que abarca 200kb y tiene 27 exones, localizado en el cromosoma 13q14.1-q14.2. Este gen codifica una proteína de 928 aminoácidos implicada en el control del ciclo celular. *RB1* contiene tres dominios principales: los dominios N y C-terminal, y un "bolsillo" central, que a su vez se compone de 2 subdominios unidos por un conector^[129]. Cada dominio incluye varias superficies distintas de unión a diversas proteínas celulares que se asocian a la proteína Rb1 (pRb1) a través de estas regiones^[130].

Los niveles de la proteína Rb1 no se alteran significativamente durante el ciclo de división celular, pero sí su grado de fosforilación, modulando su actividad y desempeñando un papel clave en la regulación de genes implicados en la proliferación celular a través de su interacción con factores de transcripción. pRb1 hipofosforilada tiene un potente efecto antiproliferativo^[131] y tanto la inactivación funcional como la inactivación génica por delección de *RB1* conducen a una progresión descontrolada del ciclo celular, en algunos casos vinculada a un aumento de la apoptosis^[132].

La pérdida funcional de *RB1* se ha asociado al desarrollo de enfermedad metastásica en tumores de diversa etiología entre los que se encuentra el CaPr. En modelos animales, la pérdida de función del gen *RB1* induce una hiperproliferación prostática y desregulación de la expresión de genes que intervienen en el control del ciclo celular regulados por E2F^[133,134]. En otros trabajos preclínicos tanto la sobreexpresión de ciclina D, como la inactivación de *RB1* se consideran alteraciones proliferativas insuficientes para favorecer el desarrollo de tumores de próstata^[133], a diferencia de lo que ocurre cuando se combina la pérdida de *RB1* con la pérdida del gen supresor tumoral *TP53* en modelos de ratones genéticamente definidos^[135]. Los análisis de expresión génica en nódulos prostáticos murinos llevados a cabo por Thangavel et al.^[136] demostraron que la regulación del receptor de motilidad celular RHAMM por la vía RB1/E2F es vital para la transición epitelial-mesenquimatosa, la motilidad y la invasión de las células cancerosas siendo responsable del desarrollo de un fenotipo prometastático.

Desde que en 1990 se describiera por primera vez la pérdida de *RB1* en CaPr^[137], la deficiencia de *RB1* se ha relacionado en múltiples trabajos con el CPRC^[63,64,138,139], observándose una mayor expresión de E2F1 y E2F3 en estos tumores^[138,140] y siendo su pérdida casi universal en

el CaPr neuroendocrino, una variante agresiva de la enfermedad independiente del AR que también se caracteriza por frecuentes alteraciones concurrentes en *PTEN* y *TP53*^[141-143]. Se ha descrito que la pérdida de *RB1* induce la desregulación mediada por E2F1 del locus del AR. Este evento es suficiente para inducir una actividad del AR no controlada y la progresión a CPRC^[144,145], sugiriendo, que *RB1* desempeña un papel importante en la progresión del tumor, que es independiente de los genes directamente asociados con el ciclo celular. Concretamente, el AR activado induce la expresión de ciclina D favoreciendo la formación de complejos CDK4/ciclina D y dependientes de CDK2 activos, conduciendo a la hiperfosforilación e inactivación de *RB1*^[146], por el contrario, la regulación a la baja del AR en modelos celulares de CaPr independientes y dependientes del AR aumenta la hipofosforilación de la proteína Rb1, lo que se correlaciona con una detención del ciclo celular G0/G1^[147,148], que puede superarse mediante la sobreexpresión de E2F1^[149].

Por otra parte, la transcripción del AR puede estar regulada por complejos RB1-E2F ya que se ha confirmado la unión directa de E2F1, E2F3 y RB1 al promotor del AR^[138]. Se ha descrito en muestras de CPRC que E2F1 es capaz de reprimir la formación ARN mensajero (ARNm) y la expresión de proteínas inhibiendo la actividad del promotor del AR^[150], al igual que existe una correlación entre la pérdida de *RB1*, la sobreexpresión de E2F1 y la sobreexpresión del AR^[138], por lo que se piensa que la regulación RB1-E2F del promotor del AR puede ser positiva o negativa en función del contexto celular. Así mismo, en tumores con deficiencia de *RB1* se ha observado la sobreexpresión de genes directamente relacionados con el AR, como *KLK3* y *TMPRSS2*, aumentando tanto en presencia como en ausencia de andrógenos, la unión del AR al promotor y potenciador del gen *KLK3*^[138], así como con genes implicados en el control del ciclo celular, incluidos *CDK1* y *CCNA2*, que también son objetivos de E2F^[151].

Se ha descrito cierta relación entre la pérdida de *RB1* con la sensibilidad a la irradiación, compuestos con efecto antiproliferativo y ciertos tipos quimioterapia^[152,153], destacando estudios recientes que identifican la pérdida de *RB1* como un biomarcador predictivo de sensibilidad a tratamientos con inhibidores de las Aurora quinasas en el contexto de letalidad sintética^[154,155], planteándose el verdadero alcance de estos hallazgos a nivel terapéutico. Recientemente Nava-Rodríguez et al. describieron que los pacientes con CPRC con exposición previa a taxanos y iSRA, tienen una alta prevalencia de aberraciones genómicas de *RB1*, siendo

comunes las variantes estructurales, incluidos los reordenamientos, en el CaPr primario, clínicamente agresivo, volviéndose más frecuentes conforme la enfermedad se encuentra en fases más avanzadas, debido a presiones selectivas del tratamiento^[156]. Concretamente en este trabajo, el 28% de los tumores analizados presentó heterogeneidad en la expresión de la proteína Rb1, lo que tendría importantes implicaciones para ensayos en curso con inhibidores de CDK4/6, ya que la ausencia de Rb1 funcional se plantea como un biomarcador predictivo negativo de la respuesta a estos nuevos agentes, pendiente de validación.

1.5.4.2 AMPLIFICACIÓN MYC

La alteración en el número de copias (CNA) es un cambio genético común en el CaPr. Si bien la mayoría de las CNA consisten en pérdidas^[157–159], la amplificación de la región cromosómica que contiene el brazo largo del cromosoma 8 es un evento frecuente en CaPr, existiendo varios picos de amplificación entre los que destaca el 8q24.21 que alberga el oncogén *MYC*. Los genes *MYC* son una familia de protooncogenes (*L-MYC*, *N-MYC* y *C-MYC*) que promueven la proliferación celular al mejorar la eficiencia de la síntesis de RNA ribosómico, esto aumenta el número de ribosomas y la capacidad de producción de proteínas de las células tumorales^[160,161], cooperando con la desregulación de la vía *PI3K/AKT/mTOR* para promover la supervivencia de las células prostáticas.

Por otra parte, la amplificación de *N-MYC* se considera anecdótica en el adenocarcinoma de próstata con una incidencia aproximada del 5%^[162], a diferencia de lo que ocurre en el CaPr neuroendocrino con porcentajes entorno al 40%^[163]. La importancia de *N-MYC* en el curso evolutivo del CaPr neuroendocrino ha sido descrita en diversos estudios^[141,164–166]. La amplificación del gen *L-MYC* se ha observado en un 20% de los tumores prostáticos con un Gleason score ≥ 7 ^[167,168]. La contribución relativa de los tres homólogos de la familia *MYC* a la progresión del CaPr no ha sido bien definida, pero la exclusividad mutua de *N-MYC* y *L-MYC* y su incidencia reducida respecto a *C-MYC*^[167], sugieren que su papel sea secundario.

Entre las regiones frecuentemente amplificadas en el brazo largo del cromosoma 8 en el CaPr, encontramos la amplificación del gen *NBN* (8q22.1), que codifica la proteína del sensor de daño del DNA NBS1, así como el gen *PCAT1*, implicado en la proliferación celular mediante el

mantenimiento de la estabilidad y la actividad transcripcional dependiente de *C-MYC*^[169]. Los procesos de señalización mediados por el AR permiten regular la expresión de *C-MYC*, silenciándolo en tejido prostático normal y sobreexpresándolo en el fenotipo tumoral de CaPr^[170,171]. Se ha demostrado que *C-MYC* confiere resistencia a los antagonistas de señalización del receptor de andrógenos y promueve el crecimiento independiente de andrógenos de las células prostáticas^[172], siendo esta característica determinante en el curso evolutivo de la enfermedad y observándose una expresión elevada de *C-MYC* y/o *N-MYC* en las fases más avanzadas de la misma^[163].

Un importante regulador de la proliferación de células epiteliales luminales y de la expresión de *C-MYC* a nivel fisiológico es *SPOP*. Se ha observado una fuerte correlación inversa entre la actividad de *C-MYC* y los niveles de ARNm de *SPOP* en dos cohortes independientes de pacientes con CaPr^[173] y se ha sugerido que *SPOP* tenga un papel, como un importante gen supresor de tumores. Sin embargo, *SPOP* es uno de los genes más frecuentemente afectados por mutaciones puntuales somáticas no sinónimas en el adenocarcinoma de próstata primario. En un estudio recientemente publicado en CaPr metastásico hormonosensible, las alteraciones genómicas en la vía del AR, *MYC* y *TP53* se asociaron con peor pronóstico y un tiempo a la resistencia a la castración más corto respecto a aquellos tumores en los que se identificaron alteraciones en *SPOP* y *WNT*^[174].

1.5.4.3 PTEN

La pérdida del gen supresor *PTEN*, localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23), es uno de los eventos genómicos que con más frecuencia ocurre en CaPr, sobre todo en la enfermedad resistente a la castración^[63,65,175], lo que sugiere que la pérdida de *PTEN* se asociaría al desarrollo de tumores biológicamente más agresivos. Concretamente, la inactivación de *PTEN* por delección o mutación se identifica en aproximadamente el 17% de los tumores de próstata localizados^[64]. Sin embargo, aproximadamente el 40-50% de los pacientes con CRPC presentan delecciones o mutaciones deletéreas de *PTEN*^[65,176,177]. Estas alteraciones son las principales responsables de la disrupción de la vía *PI3K/AKT* frecuentemente observada en CPRCm^[65]. Por otra parte, se ha descrito que las mutaciones de *PTEN* y las mutaciones del gen supresor tumoral *SPOP* son mutuamente excluyentes en el CaPr

primario, sin ser este hallazgo tan evidente en la enfermedad avanzada^[65], lo cual, implica que estas alteraciones genéticas comparten una vía común en el proceso de carcinogénesis en el CaPr.

En CaPr la señalización a través de la vía *PI3K/AKT* se activa principalmente a partir de la pérdida de la función del gen supresor tumoral *PTEN*. Este gen codifica la proteína PTEN, que contiene dos dominios en su molécula, el de fosfatasa en la región N-terminal y el dominio C2 en la región C-terminal, ambos son necesarios para la actividad enzimática, actuando una fosfatasa con doble especificidad, convirtiendo el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI (3,4,5) P3 o PIP3) en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI (4,5) P2 o PIP2)^{[178][179]}. De esta manera, *PTEN* modula una enorme cantidad de procesos celulares, incluyendo polaridad, motilidad celular, senescencia celular y modulación del microambiente tumoral, ejerciendo funciones clave para mantener la integridad genómica^[180]. Además, la actividad fosfatasa de *PTEN* parece mediar en aspectos de la inmunidad innata y adaptativa^[181,182]. Su papel principal como un antagonista directo de la actividad de *PI3K*, una familia de enzimas que convierte PIP2 en PIP3, se traduce en la activación de la serina/treonina/proteína quinasa RAC- α (AKT) y en última instancia en la modulación de la señalización de *mTOR*, que tiene funciones clave en la regulación de la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, el metabolismo, la diferenciación y la invasión tumoral^[177,180].

Una amplia evidencia apoya un papel para *PTEN* en el núcleo que es completamente independiente de *PI3K*. *PTEN* se localiza en los centrómeros, y las mutaciones de *PTEN* que interrumpen esta interacción conducen a la inestabilidad centromérica^[177]. Las células con pérdida de *PTEN* demuestran roturas espontáneas de doble cadena de DNA, probablemente debido a la regulación mediada por *PTEN* de la expresión de la proteína de reparación del DNA, RAD51^[183,184]. La sumoilación podría regular la localización nuclear de PTEN y contribuir a su papel en la reparación de daños en el DNA^[184]. Modelos preclínicos de CaPr con pérdida combinada de *PTEN/TP53* muestran respuestas a esta combinación de tratamientos^[185,186], sentando la base de ensayos clínicos que evalúan la terapia combinada de inhibidores de *PI3K* con inhibidores de *PARP* (NCT03586661).

Las vías señalización de *AKT* y del *AR* están directamente implicadas en el desarrollo del CaPr. *AKT* puede fosforilar el *AR* en Ser-210 y posteriormente inhibir la transactivación del *AR*. Diversos estudios preclínicos muestran una actividad antitumoral sinérgica con la inhibición combinada de la vía *AR* y la vía *PI3K/AKT/mTOR*^[187-189]. La inhibición de cualquiera de estas vías provoca frecuentemente la activación de la otra, por lo que el planteamiento de una estrategia terapéutica que bloquee ambas tiene una base sólida. De hecho, los resultados preliminares del estudio fase III IPATential 150^[190] demuestran que añadir un inhibidor de *AKT* (ipatasertib) al tratamiento con un iSRA (abiraterona) prolonga el tiempo a la progresión radiológica en los pacientes con pérdida de *PTEN*, pero no en aquellos con *PTEN* funcional.

Existen estudios preclínicos que han implicado la pérdida funcional cooperativa de *TP53*, *RB1* y *PTEN* con el desarrollo de enfermedad rápidamente invasiva, metastásica y letal^[135], destacando la importancia de la heterogeneidad intratumoral en el CaPr localizado, así como la presencia de alteraciones subclonales en *TP53* y *PTEN*^[191,192]. Por otra parte, existen datos publicados que muestran que la amplificación de *MYC* y la pérdida de *PTEN* combinada e impulsada por el locus regulador *HOXB13* favorecen el desarrollo de inestabilidad cromosómica con desarrollo de tumores más agresivos con un alto potencial metastásico^[193].

Desde otra perspectiva, tenemos datos que indican que la pérdida de *PTEN* da lugar a una regulación positiva de la ciclina D y, por lo tanto, una hiperfosforilación e inactivación de *RB1*^[194]. La pérdida de p18 o la sobreexpresión de *CDK4* contribuyen de forma sinérgica con la pérdida de heterocigosidad (LOH) de *PTEN* activándose *AKT* y favoreciéndose como consecuencia la inactivación de *RB1*^[195]. Respecto a *C-MYC*, aunque su sobreexpresión se ha asociado a un aumento de la capacidad proliferativa de las células prostáticas sin requerir mutaciones en *RB1* adicionales^[196], existen datos que sugieren que la sobreexpresión indirecta de ciclinas, como consecuencia de otras mutaciones iniciadoras, por sí sola es insuficiente para eliminar todas las funciones supresoras de *RB1*. Por último desde el punto de vista epigenético, se han descritos diversos mecanismos de evasión al tratamiento con TDA por parte de las células del adenocarcinoma de próstata, la pérdida de *RB1* parece facilitar la plasticidad del linaje y el potencial metastásico en el contexto de la pérdida de *PTEN*, con una pérdida adicional de *TP53* que impulsa la resistencia a los antiandrógenos y un cambio a un perfil transcripcional que se asemeja al CaPr neuroendocrino^[197,198].

Un estudio reciente demuestra a partir del análisis de secuenciación masiva de 285 tumores, tanto de enfermedad localizada como de enfermedad metastásica hormonosensible y hormono resistente, que las alteraciones genómicas de *TP53*, *PTEN* o *RB1* son eventos comunes en todo el espectro del CaPr clínicamente significativo^[139]. Dichas alteraciones se asocian a resultados progresivamente más pobres, identificando un subgrupo de pacientes de mal pronóstico e indicando que la pérdida combinada de estos genes conduce a una biología de la enfermedad más agresiva a través de mecanismos celulares cooperativos. No obstante, el 11% de los pacientes con enfermedad localizada analizados expresaban una pérdida en al menos dos de estos genes, lo que sugiere que estas alteraciones pueden estar presentes de forma precoz en un subconjunto de pacientes, asociándose a una enfermedad más agresiva caracterizada por una señalización proliferativa alterada y una inestabilidad genómica temprana mucho antes del desarrollo de la resistencia a la castración e identificando pacientes candidatos a una intensificación de tratamiento sistémico.

1.5.4.4 REORDENAMIENTO *TMPRSS2-ERG*

El reordenamiento de *TMPRSS2-ERG* se describió por primera vez en 2005, a partir de la translocación de la región cromosómica *TMPRSS2* y el factor de transcripción *ERG* perteneciente a la familia *ETS* de factores de transcripción (*ERG*, *ETV1*, *ETV4* y *ETV5*)^[199–201]. *TMPRSS2* es un gen regulado por andrógenos, situado a 3Mb de distancia en el mismo cromosoma 21q22. *ERG* se encuentra sobreexpresado en el 40-50% de los tumores de próstata primarios^[202], describiéndose los reordenamientos de los genes *ETS*, en particular la fusión *TMPRSS2-ERG* en un 30-50% de los tumores de próstata recién diagnosticados y que no han recibido tratamiento y representando > 90% de los reordenamientos de *ETS*^[203].

Las fusiones del gen *ETS* son eventos tempranos en el desarrollo de CaPr, detectándose en células basales aisladas de biopsias prostáticas^[204], e identificándose como marcadores de heterogeneidad clonal, por lo que se considera de especial importancia entender el origen y las implicaciones de estos reordenamientos. Mani et al. demostraron que la señal mediada por andrógenos induce la aproximación de *TMPRSS2* y *ERG* en una línea celular de CaPr dependiente de andrógenos, LNCaP, y facilita la fusión de ambos genes cuando las células son sometidas a un agente que causa rupturas de doble cadena en el DNA como la radiación

ionizante^[205]. Esta fusión no se observó en cambio en DU145, otra línea celular de CaPr que se caracteriza por no ser sensible a andrógenos.

Desde el punto de vista diagnóstico, la fusión *TMPRSS2-ERG* puede ser detectada a partir de muestras de orina tras la realización de un tacto rectal, asociándose con el diagnóstico de CaPr con una especificidad del 93% y un valor predictivo positivo 94%, independiente al valor de *PCA3*^[206]. Disponemos de datos de estudios que han evaluado el tratamiento con el iSRA, abiraterona, en pacientes con CPRCm sin tratamiento quimioterápico previo identificando una asociación significativa entre la presencia del reordenamiento de *ERG (TMPRSS2-ETS)* con la magnitud de descenso del PSA^[207]. Por otro lado, dentro del estudio fase III COU-AA-302, se evaluó el beneficio de la presencia de este reordenamiento de *ERG (2+Edel)* con la supervivencia libre de progresión durante el tratamiento con abiraterona y prednisona sin encontrarse diferencias significativas en función la presencia del reordenamiento *TMPRSS2-ERG*^[208].

Las limitaciones para la obtención de muestras adecuadas para realizar estos análisis en la práctica clínica habitual, ha favorecido la implementación de análisis a partir de células tumorales circulantes (CTCs) en estos estudios. Danila et al. analizaron la sensibilidad al tratamiento con abiraterona, en función del estatus *TMPRSS2-ERG* en pacientes con CPRCm. El aislamiento de las células se llevó a cabo a través de la máquina semiautomática Cell Search (Veridex) y la fusión *ERG* a través de una transcripción inversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en las CTCs y por técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH) en el tejido tumoral, obteniéndose una detección de la fusión *TMPRSS2-ERG* en el 37% de las muestras analizadas con independencia del tipo de muestra, aunque la concordancia fue del 65%, no se identificaron diferencias en supervivencia entre aquellos pacientes con presencia o no del reordenamiento *TMPRSS2-ERG*, pero en este caso, se incluían pacientes que habían recibido tratamiento previo con agentes quimioterápicos^[209]. Los datos publicados recientemente del estudio PREMIERE, en este caso con pacientes con CPRCm tratados en primera línea con enzalutamida sin tratamiento quimioterápico previo, no mostraron diferencias significativas en respuesta por PSA, supervivencia libre de progresión radiológica o SG en base al estatus del reordenamiento *TMPRSS2-ERG*^[210].

Se ha comprobado que la pérdida de *PTEN* es más frecuente entre los tumores de próstata localizados con reordenamiento del gen *TMPRSS2-ERG* en comparación con aquellos sin esta alteración^[211,212]. Reid et al.^[213] analizaron mediante técnicas de FISH, 308 pacientes diagnosticados de CaPr manejados de forma conservadora, demostrando una fuerte interacción entre el reordenamiento del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y la pérdida del gen *PTEN*. Los resultados publicados destacaban la presencia de un subgrupo de pacientes de buen pronóstico (54% del total analizado), sin pérdida del gen *PTEN* y que carecían del reordenamiento del gen *TMPRSS2-ERG*, con una SCE de 85,5% a los 11 años. Así mismo se identificó otra subpoblación de pacientes que representaba un 6% del total con pérdida del gen *PTEN* y ausencia del reordenamiento de gen *TMPRSS2-ERG*, estos pacientes tenían peor pronóstico respecto a los otros subgrupos (13,7% de supervivencia cáncer específica a los 11 años) a pesar de que una proporción significativa de los mismos presentaba un grado de Gleason ≤ 7 . La relación entre estos dos eventos ya había sido previamente descrita en modelos animales^[211,212], no obstante esta trabajo fue la primera serie amplia que analizó el valor de la pérdida de *PTEN* y del reordenamiento *TMPRSS2-ERG* de forma conjunta, proponiendo su utilidad en la estratificación de pacientes, de hecho, ha permitido la identificación de un subgrupo de mal pronóstico con pérdida de *PTEN* en ausencia de reordenamiento *TMPRSS2-ERG* susceptible de requerir una intensificación de tratamiento dentro de ensayos clínicos con fármacos dirigidos a la vía *PI3K/AKT/mTOR*.

2 HIPÓTESIS

Basándonos en:

- I. Las mutaciones de la línea germinal *BRCA2* son un factor pronóstico independiente para el pronóstico del CaPr y la respuesta a los tratamientos disponibles.
- II. Los tumores con mutaciones germinales en *BRCA2* se asocian con inestabilidad cromosómica debido a una deficiencia subyacente en la reparación del DNA.

Proponemos que:

- I. La pérdida cromosómica de *BRCA2* a nivel germinal y por lo tanto de su función en las células del CaPr, podría actuar como una ventaja evolutiva del cáncer, favoreciendo la oncogénesis, el crecimiento, la progresión y/o la resistencia a los tratamientos habituales, al favorecer la rápida adquisición de una mayor inestabilidad cromosómica y, por ende, estar asociada con un peor pronóstico y con características clínico-patológicas adversas al diagnóstico.
- II. Dicha inestabilidad cromosómica no sería completamente aleatoria, al existir un mayor riesgo de rotura y por ello de reparación incorrecta en aquellas regiones de la cromatina que más se transcriben en respuesta directa al AR o a la deprivación de andrógenos. Los tumores con pérdida de *BRCA2* tendrían más frecuencia de marcadores cromosómicos de andrógeno-dependencia como la fusión *TMPRSS2-ERG*, así como la acumulación de otras alteraciones como la amplificación de *MYC*, la pérdida de *PTEN* y/o del gen del retinoblastoma o la pérdida de heterocigosidad en *BRCA2*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Validar el valor pronóstico de las mutaciones germinales de *BRCA2* para supervivencia cáncer específica en cáncer de próstata.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Confirmar el valor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión metastásica y supervivencia libre de resistencia a la castración en los pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2*.
- Describir la frecuencia de las alteraciones genómicas en *PTEN*, *MYC*, *RB1* y *sBRCA2*, así como, los reordenamientos de *TMPRSS2-ERG* en los tumores primarios de los pacientes con y sin mutaciones germinales en *BRCA2*.
- Describir las asociaciones pronósticas de estas alteraciones en *PTEN*, *MYC*, *RB1* y *sBRCA2*, así como, los reordenamientos de *TMPRSS2-ERG*, identificando factores moleculares que modifiquen el pronóstico de los tumores *BRCA2*.
- Analizar el valor pronóstico para supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de progresión metastásica y supervivencia libre de resistencia a la castración de aquellos tumores de próstata con mutaciones de *BRCA1* a nivel germinal.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio de casos y controles ambispectivo y multicéntrico. Donde se permitió la inclusión de casos y controles ya diagnosticados (retrospectivos) y nuevos diagnósticos. A partir de la inclusión de los pacientes la recogida de nuevos datos de seguimiento fue prospectiva. El estudio se inició en enero de 2015 y se estableció como punto de corte en el seguimiento para este análisis el 31 de diciembre de 2019. El estudio de las alteraciones de los genes de interés fue realizado conforme las muestras fueron recibidas en el laboratorio de Cáncer de Próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Este estudio fue evaluado y autorizado por el área de epidemiología de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) y por los comités éticos de los centros participantes. Todos los participantes, casos y controles, prestaron consentimiento para el seguimiento de sus datos con el propósito del estudio, salvo aquellos casos de pacientes fallecidos en los que el comité de ética de referencia otorgo la exención de consentimiento informado para estas situaciones.

4.2 POBLACIÓN A ESTUDIO

Los casos fueron identificados a partir de cohortes hospitalarias de unidades de consejo genético y/o Oncología, identificándose individuos de familias con mutación germinal en *BRCA2* en los cuáles se confirmó la presencia de la mutación (a priori o a posteriori) o bien casos esporádicos sin historia familiar donde se encontró la presencia de una mutación germinal en *BRCA2*. Entre los casos existen pacientes incluidos directamente en el estudio PROREPAIR-A (CNIO-CP-02-2015) identificados como portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* así como pacientes inicialmente esporádicos incluidos en el estudio PROREPAIR-B^[33] pero identificados tras su análisis como portadores de mutaciones germinales patogénicas en *BRCA2*.

Los controles han sido identificados a partir de cohortes de pacientes ya estudiados para la presencia de mutaciones de *BRCA2* dentro de los estudios BRCAPROS (CNIO-CP-01-2014) y BRCARAD (CNIO-CP-01-2015) o de los estudios PROREPAIR-B y PROREPAIR-C. A priori se procedió a un apareamiento de los casos con los controles en una proporción de 1:2 según

características clínico-patológicas pronósticas como el grado de Gleason (Gleason <8 vs ≥8), el estadiaje al diagnóstico (M1 vs M0), el valor del PSA al diagnóstico y el tratamiento local recibido sobre el tumor primario (prostatectomía radical vs radioterapia).

4.3 TAMAÑO MUESTRAL

Dado que se trata de un estudio de caracterización de tumores con mutaciones germinales en *BRCA2*, identificadas a partir de estudios previamente definidos, no se pudo establecer un tamaño muestral exacto a priori ya que se desconoce la frecuencia de mutaciones germinales en *BRCA2* en la población analizada.

4.4 SELECCIÓN DE SUJETOS PARA EL ESTUDIO

4.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Comprobación histológica del diagnóstico de CaPr.
2. Estatus de portador conocido de la mutación germinal en el gen *BRCA2*.
3. Seguimiento mínimo de 3 años con determinación de niveles de PSA periódicos según las guías clínicas de la institución.
4. Disponibilidad de el tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina proveniente de la biopsia diagnóstica y/o de la prostatectomía radical.

4.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Tratamiento con radioterapia externa o braquiterapia sobre pelvis o cualquier órgano intrapélvico, independientemente de su indicación, administrado antes de la biopsia prostática y/o de la prostatectomía radical.
2. Tratamiento con hormonoterapia neoadyuvante (con agonistas o antagonistas de la LHRH y/o antiandrógenos) previo a la biopsia prostática y/o a la prostatectomía radical.

4.4.3 SELECCIÓN DE CONTROLES

La selección de los controles se llevó a cabo siguiendo los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos, salvo que todos los sujetos seleccionados debían tener estatus de no portador de mutaciones germinales en genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA.

4.5 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

4.5.1 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

- Datos demográficos: fecha de nacimiento.
- Antecedentes personales: estatus de portador presente/ausente de la mutación germinal *BRCA2* y *BRCA1*.
- Basales al diagnóstico: fecha de diagnóstico, PSA al diagnóstico, estadio tumoral TNM, Gleason score en la biopsia y/o la pieza de prostatectomía y Grupo de riesgo según la clasificación D'Amico^[214].
- El grado de Gleason, debido a la alta variabilidad inter-observador en su clasificación, ha sido revisado por un patólogo especialista en tumores genito-urinarios asociado a la Unidad de Cáncer de próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.
- Tratamiento: PSA pre-tratamiento (puede ser el mismo del diagnóstico si el tratamiento no es diferido), tipo de tratamiento local administrado (prostatectomía radical o radioterapia), estadio tumoral al diagnóstico para pacientes sometidos a tratamiento con radioterapia o estadio tumoral quirúrgico, administración de hormonoterapia neo/adyuvante (<6 meses, ≥ 6 meses).
- Seguimiento: Recaída metastásica (si/no) y fecha. Resistencia a la castración (si/no) y fecha. Fecha de último seguimiento y/o muerte, causa de muerte (cáncer específica o no).

4.5.2 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGUIMIENTO

3.5.2.1 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

La supervivencia libre de progresión metastásica (SLPM) fue calculada desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de identificación de la progresión metastásica. Se definió progresión metastásica como la evidencia de enfermedad diseminada fuera del área pélvica confirmada por pruebas de imagen convencionales (TC Toraco-abdomino-pélvico y gammagrafía ósea). Aquellos pacientes con enfermedad ganglionar mayor de 1,5 cm en el eje corto por encima de la bifurcación de las iliacas fueron considerados como metastásicos. En aquellos pacientes en los que la progresión metastásica no había ocurrido al finalizar el estudio, la supervivencia se calculó hasta la última fecha de revisión y el paciente fue censurado para dicho evento.

3.5.2.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

La supervivencia libre de resistencia a la castración (SLRC) fue calculada desde la fecha de inicio de la hormonoterapia hasta la fecha de adquisición de enfermedad resistente a la castración definida por tres subidas consecutivas de PSA, con 1 semana de separación, dando como resultado dos aumentos del 50% sobre el PSA Nadir, con PSA >2 ng/ml en presencia de un rango de testosterona compatible con castración (Testosterona <50ng/ml)^[215]. Los pacientes que iniciaron tratamiento hormonal pero no cumplieron los criterios descritos de resistencia a la castración a fecha del último seguimiento fueron censurados a esa fecha.

3.5.2.3 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

La supervivencia cáncer específica (SCE) fue calculada desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte como consecuencia de la enfermedad. Se consideró el CaPr como la causa principal de la muerte cuando el paciente falleció a causa de la progresión del cáncer, complicaciones relacionadas con la diseminación de la enfermedad, o cualquier complicación directamente derivada del tratamiento del cáncer. Cuando la causa de muerte fue otra, el seguimiento fue censurado a la fecha de la muerte. En aquellos pacientes en los que la muerte no ocurrió al finalizar el estudio, la supervivencia fue calculada hasta la última fecha de revisión y el paciente fue censurado para la ocurrencia del evento.

4.5.3 MEDICIÓN DE OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y/O ANALÍTICAS

Todas las variables continuas recogidas analizadas se han recogido como tales para evitar la pérdida de información. Posteriormente se ha procedido a la transformación de algunas de ellas en dicotómicas utilizando como puntos de corte: los valores de normalidad; valores con valor pronóstico demostrado en el contexto de la enfermedad resistente a la castración; o bien de acuerdo con su valor mediana en nuestra serie.

4.6 MUESTRAS TUMORALES Y PROCESAMIENTO DE LAS MISMAS

En el presente estudio se ha requerido el uso de muestras representativas del tumor y secciones obtenidas a partir del bloque de parafina de la biopsia prostática o de la pieza de prostatectomía radical. Para ello, los bloques de parafina fueron remitidos al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas procesándose de forma homogénea.

De los bloques de parafina se realizaron cortes a 3 micras, utilizando un micrótomo rotativo HistoCore (Leica, Wetzlar, Alemania). Se realizó tinción de hematoxilina-eosina de cada uno de ellos para confirmar la presencia de células tumorales y 5 cortes adicionales de 3 micras montadas sobre cristales portaobjetos con carga electrostática SuperFrost (VWR International, Poole, Reino Unido), para su posterior proceso de desparafinización.

Las láminas de hematoxilina-eosina de las piezas de prostatectomía radical o de la biopsia prostática bloques fueron revisadas por un especialista en anatomía patológica asociado al grupo de cáncer de próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, seleccionando aquellos bloques en los que existía mayor carga tumoral y marcando las zonas de interés, de forma simultánea se procedió a una nueva valoración del grado de Gleason. Una vez procesados, los bloques de parafina restantes fueron devueltos al centro colaborador de acuerdo a lo estipulado en el protocolo del estudio.

4.7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el presente estudio se realizaron pruebas de FISH para valorar la pérdida cromosómica grosera a nivel somático de *BRCA2*, *RB1* y *PTEN*, así como el reordenamiento cromosómico *TMPRSS2-ERG* y la amplificación de *MYC*.

HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

La hibridación fluorescente in situ, abreviada FISH, es una técnica citogenética basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí, para ello se utilizan sondas que emiten fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio de los cromosomas, detectando alteraciones genéticas tanto estructurales (translocaciones) como numéricas (ganancias y deleciones). Tiene alta sensibilidad y especificidad. Es una técnica rápida (24-48h) y pueden ser analizadas un gran número de células en poco tiempo permitiendo hibridar o unir la sonda de DNA marcada con fluorocromos con la secuencia diana en la muestra tumoral y posteriormente transformar esa secuencia en algo visible. Para el marcaje, se pueden usar marcas de fluoróforo espectralmente distintas para cada sonda, lo que hace que la visualización de nucleótidos sea más fácil.

Para la realización de la técnica FISH, se utilizaron cortes de 3 micras montados sobre cristales portaobjetos con carga electrostática SuperFrost (VWR International, Poole, Reino Unido), analizándose muestras inmediatamente adyacentes procedentes del bloque tumoral para cada una de las determinaciones. La hibridación sobre muestras parafinadas se realizó utilizando un protocolo optimizado a partir de la metodología descrita por Lambros et al.^[216]

1. Desparafinado y deshidratación de las secciones histológicas.

Se procedió a desparafinar las muestras en xileno (55°C, 3x5 minutos), posteriormente se lavaron en etanol al 100% (2x3 minutos) y se hirvieron en etanol durante 30 segundos.

Se detiene el metabolismo celular e inactivan enzimas lisosómicas como ARNasas endógenas, para conservar la morfología y la integridad de los ácidos nucleicos.

2. Pretratamientos, para permeabilizar el tejido y facilitar el acceso de la sonda a la secuencia diana:

Se colocaron las muestras a una temperatura $\geq 98^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos en tampón de pretratamiento, (kit de pretratamiento de tejido ligero SPOT, Zymed, South San Francisco, CA, EE. UU.) se enjuagaron en agua, se digirieron con solución de pepsina (Digest All-3, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) a 37°C durante 4-5 minutos en cámara húmeda, enjuagándolas en agua nuevamente antes de proceder a la hibridación.

El objetivo del pretratamiento es permitir la accesibilidad de la sonda al ácido nucleico diana. La asociación del DNA con las proteínas, reforzada por la fijación, dificulta el acceso de la sonda y es necesario un pretratamiento. La eliminación de proteínas y restos citoplasmáticos mediante la pepsina, posibilita la accesibilidad de la sonda al DNA.

3. Sondas utilizadas

Una sonda esta formada por una cadena de nucleótidos cuyo contenido (o secuencia de bases nitrogenadas es conocida) siendo complementaria de la secuencia que se quiere estudiar denominada "secuencia diana". Al emplear la técnica FISH las sondas contienen los genes de interés que se quieren examinar en la muestra empleada.

Las sondas de FISH pueden estar marcadas directamente con fluorocromos que no necesitan anticuerpos para su detección (sondas directas) o con moléculas marcadoras que si necesitan anticuerpos para su detección (sondas indirectas). Se pueden obtener a partir de DNA clonado de la región que queremos examinar.

Las sondas de secuencias únicas permiten detectar alteraciones numéricas y estructurales tanto en metafase como en interfase, las más utilizadas son las secuencias genómicas humanas clonadas en cromosomas artificiales bacterianos (BACs) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/cyto> y <http://www.genome.ucsc.edu>). La hibridación específica de cada BAC se puede localizar exactamente en el genoma humano utilizando las bases de datos UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y secuencias homólogas potencialmente fuertes con otras regiones del genoma excluidas.

En función de la estrategia empleada para la detección de translocaciones con sondas de secuencia única, podemos distinguir sondas de fusión o co-localización y sondas de separación.

En este trabajo, se elaboraron sondas de separación para la determinación del reordenamiento de *ERG* a partir de BACs. También se utilizaron sondas elaboradas a partir de BACs para la determinación del número de copias de *BRCA2* y *PTEN*. Las sondas específicas sintetizadas a partir de BACs se generaron mediante un protocolo adaptado a partir del método descrito por Summergil et al.^[217]

Los clones de BACs disponibles públicamente, se seleccionaron del Navegador del genoma Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). El DNA de BACs se extrajo usando el Kit Qiagen Plasmid (Qiagen, Crawley, West Sussex, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. La columna de resina de intercambio aniónico (punta Qiagen) se utilizó para purificar el DNA extraído, posteriormente mezclado con isopropanol y siendo lavado con etanol al 70%. Finalmente, el DNA purificado fue brevemente secado y resuspendido en 22 μ l de Tris-Cl precalentado con un pH 8,5. La concentración final del DNA de BAC osciló entre 50 y 200 ng/ μ l.

Para la amplificación del DNA de BAC se utilizó el kit de amplificación del genoma completo GenomiPhi (Kit WGA, GE Healthcare, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Se elaboró una mezcla con DNA de BAC (1 ml) y sustancia tampón (9 ml) y posteriormente se incubó a 95°C durante 3 minutos, dejándose enfriar en hielo durante los 5 minutos posteriores. Se añadieron 10 ml de mezcla de reacción de polimerasa ϕ 29 (1 ml de polimerasa ϕ 29 en 9 ml de tampón de reacción) y a continuación, la mezcla se incubó a 30°C durante un tiempo \geq 16 horas. Para inactivar la enzima la mezcla se calentó durante 10 minutos a 65°C. El DNA se precipitó y lavó con etanol al 70%. Finalmente, la concentración del DNA amplificado se midió con un espectrofotómetro.

Una vez sintetizadas las sondas a partir de BACs, su lugar de hibridación se mapeo frente a slides de metafases humanas normales (Vysis FISH slides, Abbott Molecular, Illinois, EEUU), para confirmar la ubicación de la banda cromosómica de interés y la falta de hibridación cruzada con otras regiones. Además de sondas sintetizadas a partir de BACs se utilizaron

sondas comerciales para la detección del número de copias de *RB1*, *MYC*, así como los centrómeros 8 y 10 (CEP8, CEP10) y la región subtelomérica del brazo 13q.

a. *RB1*

Para la determinación de *RB1*, se utilizaron dos sondas FISH disponibles en el mercado:

1. Una sonda comercial de ~ 202 Kb marcada directamente con Alexa fluor 555 espectro naranja y dirigida contra el locus 13q14 que abarca *RB1*. (Abbott Molecular, Illinois, EEUU).
2. Una sonda comercial de ~ 612 Kb marcada directamente con Alexa fluor 405 (espectro azul cielo o *aqua*) y dirigida contra la región subtelomérica 13q34 (SureFISH, de Agilent).

b. *MYC*

Para evaluar el estado del gen *MYC*, se utilizaron dos sondas FISH disponibles en el mercado:

1. Una sonda comercial Vysis LSI *MYC* marcada directamente con Alexa fluor 488, espectro verde y dirigida contra el locus 8q24.21 que incluye *MYC* (Abbott Molecular, Illinois, EEUU).
2. Una sonda comercial centromérica Vysis CEP8 (Alexa fluor 555, espectro naranja y dirigida contra la región centromérica 8p11.1-q11.1 (Abbott Molecular, Illinois, EEUU).

c. *BRCA2*

El análisis del estado del gen *BRCA2*, se llevó a cabo mediante la utilización de las siguientes sondas FISH:

1. Una sonda sintetizada a partir de la BAC RP11-37E23 marcada directamente con Alexa fluor 555, espectro naranja y dirigida contra el locus 13q13.1.
2. Una sonda comercial de ~ 612 Kb marcada directamente con Alexa fluor 405 (espectro azul cielo o *aqua*) y dirigida contra la región subtelomérica 13q34 locus (SureFISH, de Agilent).

d. PTEN

Las determinaciones del estado del gen *PTEN* se realizaron empleando las siguientes sondas FISH:

1. Una sonda sintetizada a partir de los BACs RP11-2010E13 y RP11-756C10 marcada directamente con Alexa fluor 555 (anaranjada) y dirigida contra el locus 10q23.
2. Una sonda comercial centromérica Vysis CEP10 (Alexa fluor 488, espectro verde) dirigida contra la región centromérica del cromosoma 10 (Abbott Molecular, Illinois, EEUU).

e. TMPRSS2-ERG

Para identificar los reordenamientos de *ERG*^[218,219], que ocurren en más de un 95% de casos con fusión de *TMPRSS2* se utilizaron sondas de separación, "Split o Break-Apart", empleando 100ng de cada sonda BAC previamente elaborada: la sonda I centromérica (Alexa fluor 555, anaranjado) y la sonda II telomérica (Alexa fluor 488, verde) correspondientes a secuencias inmediatamente 3' y 5' adyacentes a *ERG* respectivamente. Los BACs utilizados para la sonda I fueron RP11-95G19, RP11-720N21 y RP11-2511E13, correspondientes a secuencias 3'-*ERG*, mientras que los BACs utilizados para la sonda II fueron RP11-72904, RP11-115E14 y RP11-372018 correspondientes a secuencias 5'-*ERG*.

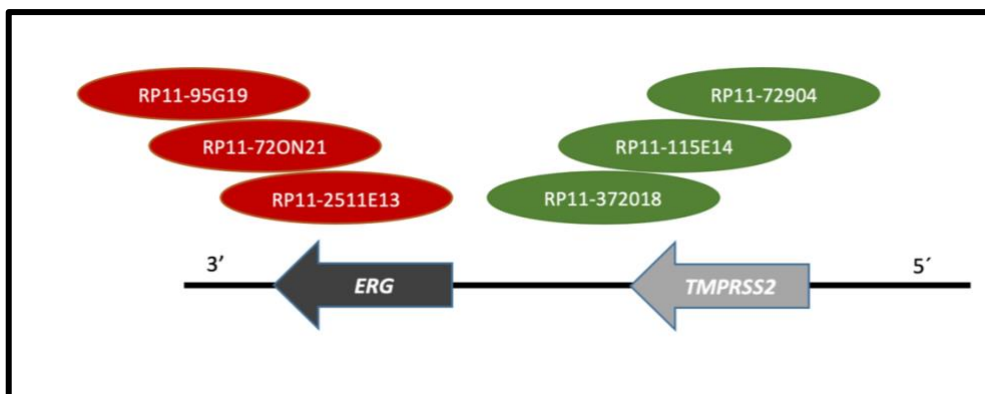


Figura 5. BACs utilizados para la elaboración de las sondas empleadas en la determinación de *TMPRSS2-ERG* mediante FISH.

4. Hibridación

Los cromosomas desnaturalizados, fijados en la slide, se expusieron a la sonda marcada con fluorescencia en base al grado de homología o complementariedad que presentan con la

secuencia diana. La hibridación/fusión tuvo lugar entre la sonda y el DNA cromosómico complementario, produciéndose una renaturalización del DNA con su secuencia diana.

Se agregaron en cada una de las slices 300 ng de "probe set" en función del tipo de análisis que se quería realizar, previamente preparado junto con 0.5 µg de COT-1/Salmon Sperm y 9.6 µl de hibridation mix (tampón de hibridación (formamida al 60%, sulfato de dextrano al 12%, 2,4×SSC, EDTA 0,14 mM pH 8, 400 µg/ml de DNA de esperma de salmón), mezclado y pipeteado sobre un cubreobjetos de plástico de 22×22 mm (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido). El portaobjetos se invirtió sobre el cubreobjetos y se selló en una cámara de hibridación metálica, la cámara se calentó a 85°C durante 2 min y luego se procedió a la incubación en cámara húmeda durante toda la noche a 37°C.

5. Post-Hibridación

Se realizó con la finalidad de eliminar la hibridación inespecífica que produce fondo y enmascara la hibridación específica, permitiendo controlar la especificidad con la que se va llevar a cabo la reacción.

Tras la hibridación, se procedió a introducir las muestras dos veces en un coplin con tampón citrato salino estándar (SSC) a 42°C, retirándose el cubreobjetos, 4 minutos en formamida al 50% /2×SSC a 42°C en dos ocasiones, 5 minutos en 2×SSC a 42°C dos veces, 3 minutos en SSCT a temperatura ambiente, 5 minutos en PBS 2x a temperatura ambiente y 1-2 minutos en etanol al 70% deshidratándose, una vez realizados estos procedimientos se secaron a temperatura ambiente y se montaron en 10 µl de Vectashield anti-fade que contiene 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), (Vector labs, Burlingame, CA, EEUU) para contraste de los núcleos, eliminándose posibles burbujas de aire presionando suavemente con la punta de un tip y colocándose a 4°C al menos durante 1 hora.

En los casos necesarios, para la rehibridación de las muestras se eliminó el DAPI y la sonda anterior lavando 1 minuto en SSCT, retirando el cubreobjetos, lavando en 2×SSC dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 minutos en 2×SSC y 4 minutos en formamida al 70% /2×SSC a 68°C. Los portaobjetos se lavaron en agua y se hibridaron posteriormente según descripción previa.

Una vez finalizado este proceso, se procedió a la adquisición de imágenes digitalizadas de todas las hibridaciones usando la plataforma ARIOL SL-50 Slide Scanner (Leica Microsystems, San Jose, CA, EEUU) del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, obteniéndose imágenes de FISH con un aumento óptico (objetivo) 20x y/o 40x que permiten un aumento digital hasta una profundidad mayor. El tiempo de análisis fue variable dependiendo de la claridad de la señal obtenida y del tamaño de la muestra. Los resultados fueron evaluados por dos investigadores independientes con experiencia en la interpretación de estas pruebas FISH.

6. Lectura

Los resultados fueron evaluados manualmente por dos investigadores independientes con experiencia en la interpretación de estas pruebas FISH. Se evaluaron un mínimo de 100 núcleos por cada muestra. Las verificaciones se realizaron en la Unidad de Cáncer de próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

a. RB1

La pérdida de *RB1* quedó establecida en aquellas muestras tanto con una pérdida homocigota como una pérdida heterocigota, presente en más del 50% de las células evaluadas, estableciéndose la pérdida de *RB1* en ausencia de sonda dirigida al locus 13q14.2 que abarca *RB1*.

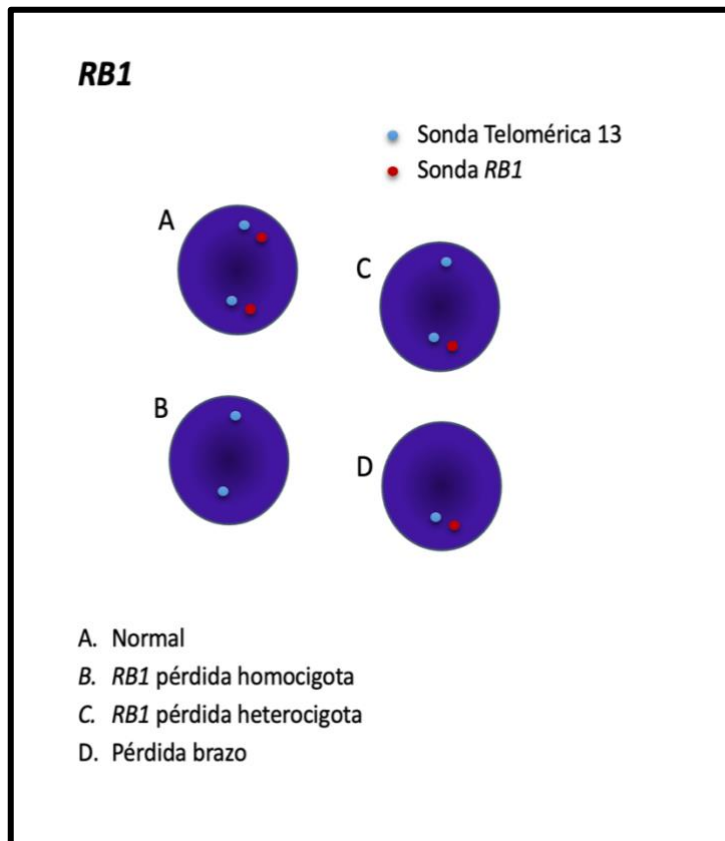


Figura 6. Evaluación de la pérdida de *RB1* por FISH.

b. MYC

La ganancia de *MYC* se definió como una relación de la presencia de la sonda dirigida contra el locus 8q24.21 frente a la sonda dirigida sobre la región centromérica 8p11.1-q11.1, (*MYC:CEP8*) $\geq 1.5:1$ y $< 2,2:1$ y la amplificación de *MYC* como una relación *MYC:CEP8* $\geq 2,2:1$ en más del 30% de las células evaluadas por cada muestra.

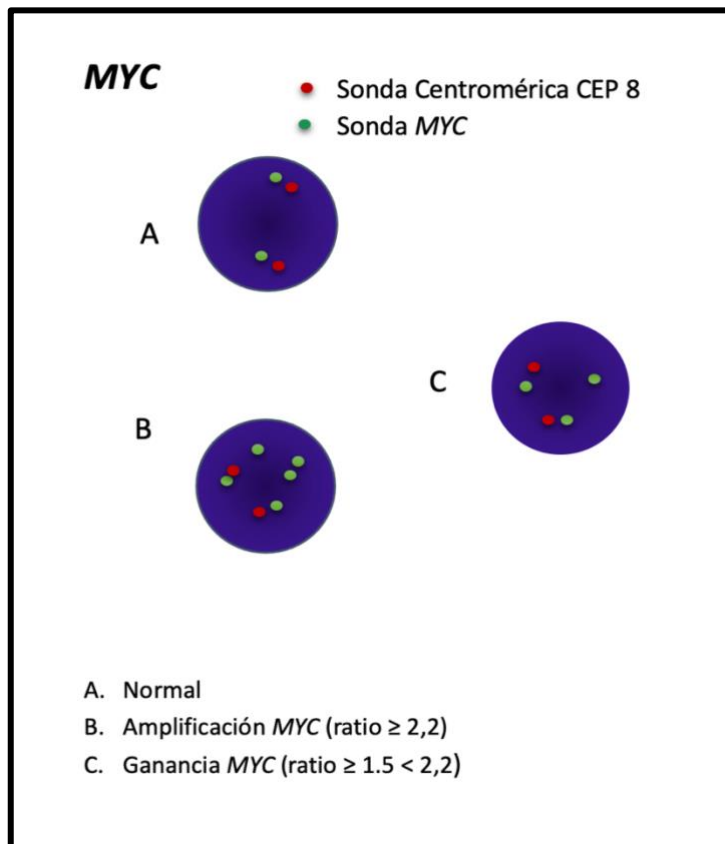


Figura 7. Evaluación de la amplificación y ganancia de *MYC* por FISH.

c. BRCA2

La pérdida de *BRCA2* quedó establecida en aquellas muestras tanto con una pérdida homocigota como una pérdida heterocigota, presente en más del 50% de las células evaluadas, estableciéndose la pérdida de *BRCA2* en ausencia de sonda dirigida al locus 13q13.1.

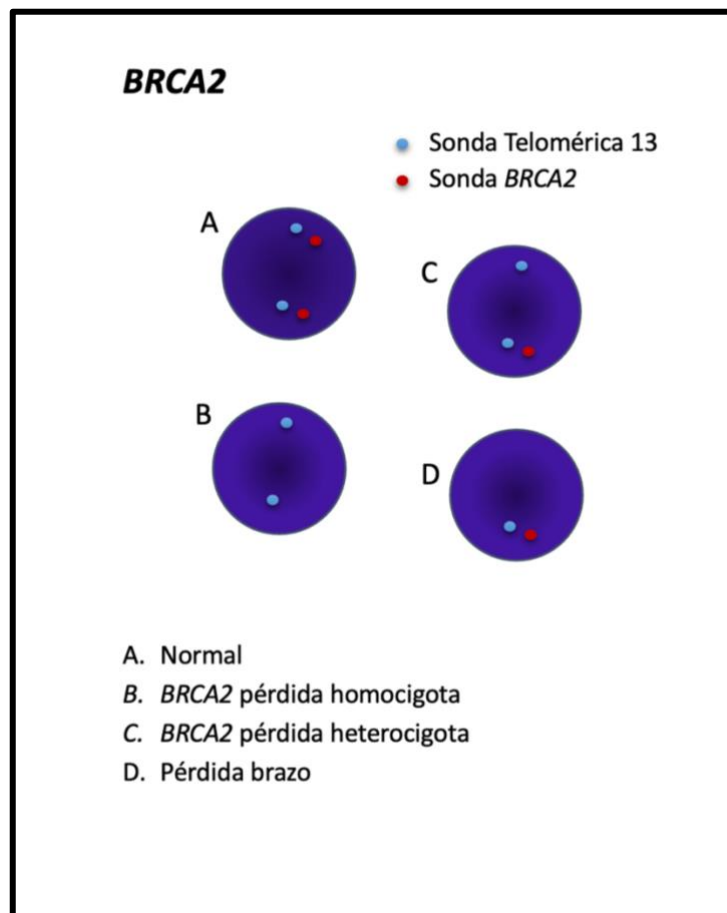


Figura 8. Evaluación de la pérdida de *BRCA2* por FISH.

d. PTEN

La pérdida de *PTEN* quedó establecida en aquellas muestras tanto con una pérdida homocigota como una pérdida heterocigota, presente en más del 50% de las células evaluadas, estableciéndose la pérdida de *PTEN* en ausencia de sonda dirigida al locus 10q23.

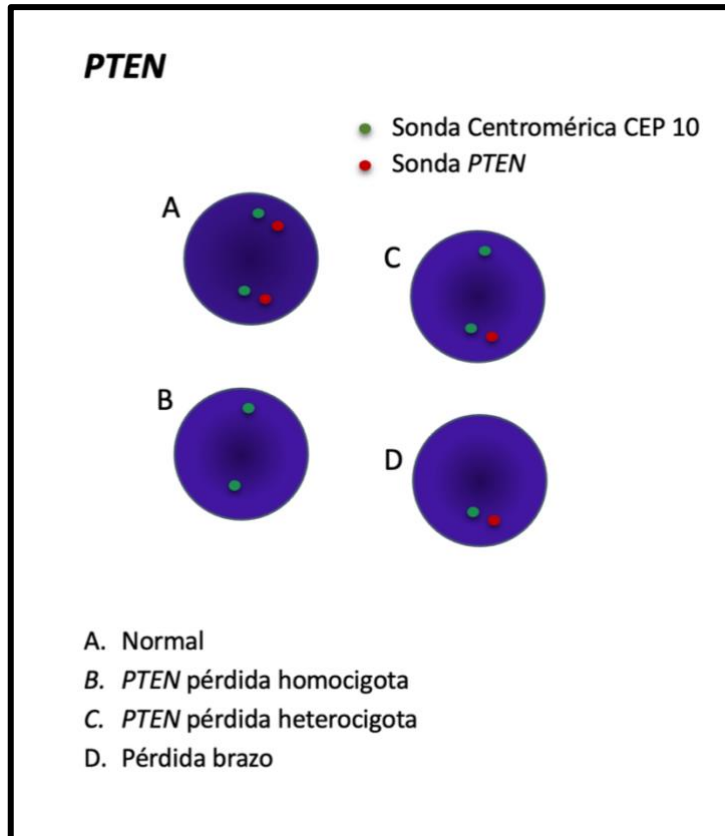


Figura 9. Evaluación de la pérdida de *PTEN* por FISH.

e. *TMPRSS2-ERG*

Los loci *ERG* no reorganizados se visualizaron en los núcleos interfásicos como señales verdes y rojas adyacentes inmediatamente. La fusión *TMPRSS2-ERG* dio como resultado la unión de secuencias de exón 1 o 2 de *TMPRSS2* generalmente a secuencias de exón 2, 3 o 4 *ERG*^[219,220]. Cuando se visualizó esta fusión, los extremos 3'-centromérico y 5'-telomérico del *ERG* se identificaban como señales separadas de rojo y verde^[199,221]. Por otra parte, muchos tumores con alteración en el patrón FISH del gen *ERG* también exhiben pérdida de la señal verde solitaria 5'-*ERG*, de acuerdo con hallazgos previos de que la región cromosómica entre *TMPRSS2* y *ERG* en el cromosoma 21, se elimina con frecuencia en los tumores con fusiones *TMPRSS – ERG*^[221,222].

En función de los patrones FISH descritos en la literatura, las muestras tumorales se estratificaron en función de si tenían loci *ERG* completamente normal, (clase Normal, señales hermanadas de las sonda roja y verde), si habían reorganizado *ERG* pero habían retenido ambos, 5' y secuencias 3'-*ERG* (clase Split, para la señal *ERG* dividida en sondas separadas 3'-roja y 5'-verde), o si habían retenido 3'-*ERG* pero no tenían evidencia de la presencia de secuencias 5'-*ERG* (clase 'Edel' para la eliminación 5'-*ERG*, careciendo de señales verdes separadas), (clase 2+ 'Edel', eliminación de secuencias 5' a *ERG* con retención de dos o más señales rojas de 3'-*ERG*)^[219].

Los núcleos de interfase dentro de cada muestra tumoral se puntuaron de acuerdo con el número de cada una de las tres señales FISH: células con señales hermanadas de rojo y verde; señales separadas 3'-*ERG* (rojo) y 5'-*ERG* (verde), señales rojas separadas 3'-*ERG* en ausencia de señales verdes aisladas 5'-*ERG*.

Se evaluaron al menos 100 núcleos tumorales por caso y en cada caso se tomó como puntuación el valor modal, generalmente presente en al menos el 50% de los núcleos analizados.

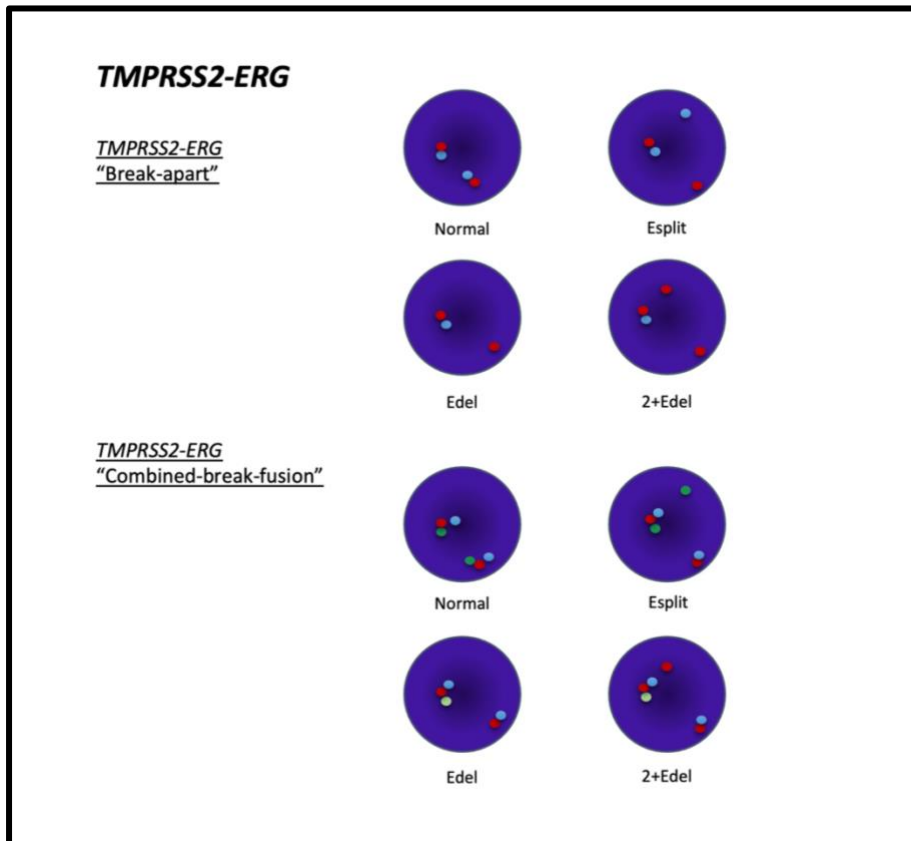


Figura 10. Evaluación del reordenamiento *TMPRSS2-ERG* por FISH.

4.8 ESTADÍSTICA

Las bases de datos fueron trasladadas a una tabla Excel para su posterior análisis con el programa estadístico STATA (Versión 14.2).

El análisis descriptivo de las variables se realizó con porcentajes para las variables cualitativas en cada categoría y con medias, medianas percentiles y rangos para las cuantitativas. El análisis de asociación entre dos variables se realizó con la prueba T de Student para comparación de medias de variables cuantitativas y la Chi-cuadrado de Pearson (χ^2) para relacionar la asociación entre variables cualitativas. Cuando alguna de las frecuencias esperadas ha sido inferior a 5, al tratarse de estudios de asociación entre dos variables categóricas, se ha utilizado la extensión de la prueba exacta de Fisher.

La valoración de la intensidad de una relación se calculó con la OR. La OR es el cociente entre las oportunidades de los sujetos expuestos y los no expuestos. La OR se muestra acompañada del Intervalo de Confianza al 95%, debido a que la OR puede tomar valores que oscilan entre 0 e infinito dando una distribución normal asimétrica, normalizando la distribución muestral con la transformación logarítmica de OR.

Se exploraron las correlaciones y nivel de concordancia entre los distintos eventos genómicos estudiados por FISH, utilizando el método de correlación de Pearson y el índice de concordancia Kappa.

La derivación de las curvas de supervivencia en los subgrupos de pacientes analizados se realizó utilizando el método de Kaplan-Meier, siendo las curvas comparadas mediante el test de log-rank. Para el cálculo del Hazard ratio de la exposición se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox en análisis univariable. Para el estudio del valor independiente de las posibles variables pronósticas significativas se construyeron modelos multivariable mediante el método de Cox en el que se introdujeron todas las variables pronósticas significativas ($p < 0,05$) en el análisis univariable de Cox y todas aquellas que se comportaron como factores de confusión.

4.9 PROTECCIÓN DE DATOS

Se procedió a la asignación de un código propio del estudio a todos los pacientes incluidos, independientemente del código previo correspondiente al estudio de origen. Todos los parámetros enumerados en la sección 4.5.1 fueron integrados en una base de datos diseñada específicamente para este estudio, junto con el identificador de las muestras a estudio. En ningún caso el investigador principal de este estudio ha tenido acceso a la información personal de los pacientes ya que tanto las muestras como la información clínica estaban previamente codificadas por los investigadores de los estudios de procedencia (donde cada centro fue responsable de mantener la documentación que asocia los datos de cada paciente con sus datos de filiación y su número de historia clínica con el código único que se le ha asignado para el estudio correspondiente, siendo este el responsable de la confidencialidad

de estos datos, así como de la preservación de las copias originales del cuaderno de recogida de datos en su centro y conforme a la legalidad vigente).

El grupo de investigación clínica en Cáncer de próstata de Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas ha sido el responsable de mantener de forma prospectiva esta base de datos en la que están identificadas y localizadas todas las muestras biológicas y todo el material de investigación derivado de ellas desde el momento de su recepción en el mismo. La base de datos que contiene la información clínica y evolutiva no ha estado emparejada con los resultados de las investigaciones experimentales en las muestras hasta el momento del análisis final.

Las muestras tumorales así como los datos asociados de los pacientes incluidos en el estudio PROREPAIR-A (CNIO-CP-02-2015), PROREPAIR-B^[33], BRCAPOS (CNIO-CP-01-2014), BRCARAD (CNIO-CP-01-2015) y PROREPAIR-C, de acuerdo con lo especificado por los pacientes en su consentimiento informado podían ser usadas en proyectos de investigación relacionados con los factores pronósticos y la investigación biológica del CaPr hereditario, de acuerdo con las disposiciones establecidas por la legislación vigente RD 1716/2011.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se adhiere a los principios establecidos en la Ley de investigación Biomédica 14/2007 (del 3 de Julio) y el Real Decreto 1716/2011 (del 18 de noviembre) que regula el tratamiento de las muestras biológicas de origen humano. Igualmente, este estudio se ha realizado conforme a lo establecido por la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter personal 15/1999 (del 13 de Diciembre) y siguiendo los principios sobre investigación en humanos establecidos en la Declaración de Helsinki.

El protocolo ha sido escrito y realizado de acuerdo con las Normas de Buena Práctica de Laboratorio, las Normas de Buena Práctica Clínica y las Normas establecidas en la Conferencia Internacional de Armonización.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES INCLUIDOS

En base a los criterios de inclusión y exclusión comentados en el apartado anterior (Material y Métodos) se incluyeron inicialmente en el análisis 80 pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* (casos) y 160 pacientes no portadores de mutaciones en genes involucrados en DDR (controles), emparejados 1:2 por grado de Gleason <8 vs ≥8, estadio al diagnóstico (metastásico vs no metastásico), valor del PSA al diagnóstico y tratamiento local recibido (prostatectomía radical vs radioterapia). Seleccionándose adicionalmente 15 pacientes con mutaciones *gBRCA1* para realizar análisis adicionales al objetivo primario (cohorte exploratoria).

A lo largo del análisis 7 casos, 33 controles y 1 paciente de la cohorte exploratoria fueron excluidos por baja calidad de las muestras tumorales para la determinación de mutaciones somáticas, evidenciada a lo largo del procesamiento, o bien por pérdida de seguimiento clínico, resultando una muestra final de 73 pacientes con mutaciones *gBRCA2*, 14 *gBRCA1* y 127 controles (Figura 11).

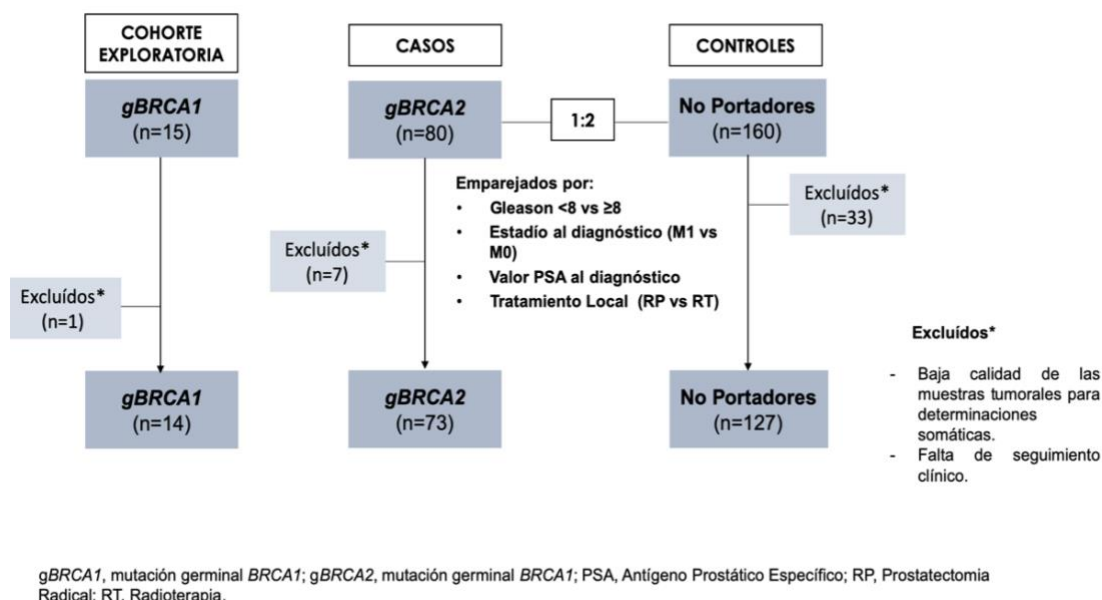


Figura 11. Diagrama de flujo de selección de pacientes incluidos en el análisis final.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES

En el momento del diagnóstico, los portadores de mutaciones *gBRCA2* eran más jóvenes que los no portadores, con una mediana de edad al diagnóstico de 62,6 años, (43,9-82,1) y 64,5, (51,1-82,7,) $p=0,027$ respectivamente. Tanto los pacientes con mutaciones *gBRCA2* como los portadores de alteraciones *gBRCA1* tenían con más frecuencia un estadio tumoral más avanzado T3 / T4 frente a T1 / T2 que los no portadores, sin encontrarse otras diferencias significativas en cuanto a mediana de PSA al diagnóstico, afectación ganglionar, enfermedad metastásica de inicio, grado de Gleason ≥ 8 o tratamiento local realizado sobre el tumor primario. (Tabla 4).

	No Portadores N (%)	Portadores <i>gBRCA2</i> N (%)	Valor P NP VS B2	Portadores <i>gBRCA1</i> N (%)	Valor P NP vs B1
Nº de pacientes	127	73		14	
Mediana Edad al diagnóstico, años (rango)	64,5 (51,1-82,7)	62,6 (43,9-82,1)	0,027*	67,6 (48,7-85,9)	0,164
Mediana PSA al diagnóstico, ng/ml (rango)	12,9 (1,5-578,0)	9,0 (0-3380)	0,077	10,1 (4,0-189,0)	0,634
Estadio Local					
T1 / T2	115 (90,6)	50 (68,5)		8 (57,1)	
T3 / T4	12 (9,4)	23 (31,5)	0,000*	6 (42,9)	0,003*
N1 al diagnóstico	5 (3,9)	8 (11)	0,073	2 (14,3)	0,144
M1 al diagnóstico	28 (22)	21 (28,8)	0,287	4 (28,6)	0,522
Grado de Gleason					
6-7	55 (43,3)	31 (42,5)		7 (50)	
8-10	72 (56,7)	42 (57,5)	0,908	7 (50)	0,632
Tratamiento local					
Sin tratamiento tumor primario	25 (19,7)	22 (30,1)		4 (28,6)	
Prostatectomía	84 (66,1)	37 (50,7)		8 (57,1)	
Radioterapia	18 (14,2)	11 (15,1)		2 (14,3)	
Desconocido	0 (0)	3 (4,1)	0,137	0 (0)	0,726

Tabla 4. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

NP; no portadores, B2; portadores *gBRCA2*, B1; portadores *gBRCA1*.

5.3 REPRESENTACIÓN MUTACIONES GERMINALES EN BRCA2 Y BRCA1

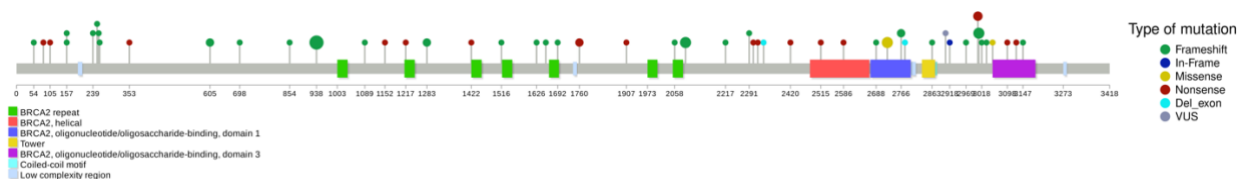


Figura 12. Representación de las mutaciones germinales *BRCA2* identificadas en el estudio en función del tipo de mutación y su localización.

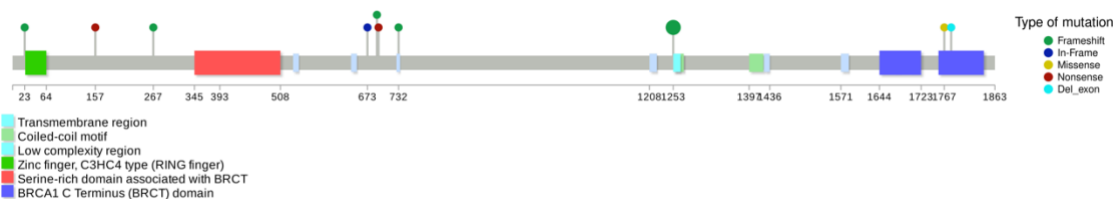


Figura 13. Representación de las mutaciones germinales *BRCA1* identificadas en el estudio en función del tipo de mutación y su localización.

5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Los portadores de mutaciones *gBRCA2* presentaron más CNA que los no portadores en todos los genes analizados, con mayor frecuencia de pérdida *sBRCA2* (43,8%), pérdida de *RB1* (54,8%) y amplificación de *MYC* (47,9%) que los controles, presentando estos una pérdida *sBRCA2* en el 11,8%, $p < 0,001$, pérdida de *RB1* en el (21,3%), $p < 0,001$ y amplificación de *MYC* en el (9,4%), $p < 0,001$. Así mismo observamos una alta frecuencia de co-delección *sBRCA2* y *RB1* en comparación con pérdidas únicas (índice de correlación de Pearson 0,96; $p = 0,001$), describiéndose una frecuencia de co-delecciones en el grupo de casos del 43,8% frente al 11,8% en los controles, $p < 0,001$.

No se apreciaron diferencias significativas al analizar la frecuencia de la pérdida de *PTEN* (34,2% en los casos y 26,8% en controles, $p = 0,213$) o el reordenamiento de *TMPRSS-ERG* (41,1% en los casos y 15% en controles, $p = 0,328$).

Los portadores de mutaciones *gBRCA1* presentaron más CNA que los no portadores en todos los genes analizados, pero la diferencia fue significativa solo para la pérdida *sBRCA2*,

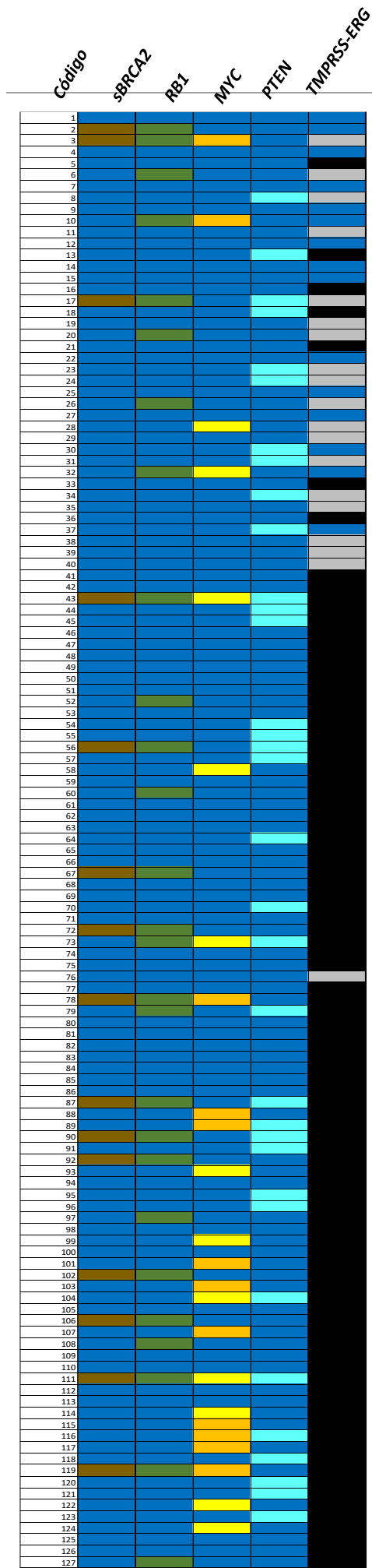
RESULTADOS

presentando los portadores de mutaciones *gBRCA1* un 35,7% de alteraciones respecto a un 11,8% en los controles (p=0,030), (Tabla 5).

	No Portadores N (%)	Portadores <i>gBRCA2</i> N (%)	Valor p NC VS B2	Portadores <i>gBRCA1</i> N (%)	Valor p NC vs B1
Nº de pacientes	127	73		14	
Pérdida <i>sBRCA2</i>	15 (11,8)	32 (43,8)	0,000*	5 (35,7)	0,030*
Pérdida <i>sRB1</i>	27 (21,3)	40 (54,8)	0,000*	5 (35,7)	0,309
<i>BRCA2-RB1</i>					
Co-delección					
Solo pérdida <i>BRCA2</i>	0 (0)	0 (0)		1 (7,1)	
Solo pérdida <i>RB1</i>	12 (9,4)	8 (11,0)		1 (7,1)	
<i>BRCA2-RB1</i> Co-delección	15 (11,8)	32(43,8)	0,000*	4 (28,6)	0,081
<i>Amplificación MYC</i>	12 (9,4)	35 (47,9)		2 (14,3)	
<i>Ganancia MYC</i>	12 (9,4)	4 (5,5)		1 (7,1)	
Sin resultados	0 (0)	2 (2,7)	0,000*	0 (0)	0,827
Pérdida <i>PTEN</i>	34 (26,8)	25 (34,2)		7 (50)	
Sin resultados	0 (0)	2 (2,7)	0,213	0 (0)	0,116
<i>Reordenamiento</i>					
<i>TMPRSS-ERG</i>	19 (15,0)	30 (41,1)		7 (50)	
Sin resultados	93 (73,2)	28 (38,4)	0,328	4 (28,6)	0,489

Tabla 5. Caracterización molecular de los pacientes incluidos en el estudio.

NP; no portadores, B2; portadores *gBRCA2*, B1; portadores *gBRCA1*.



RESULTADOS

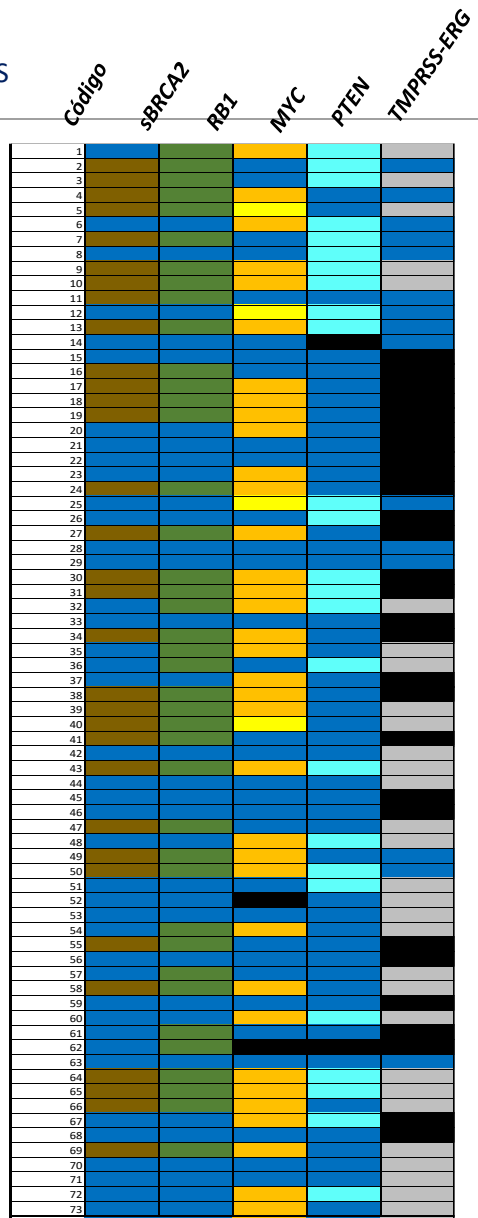
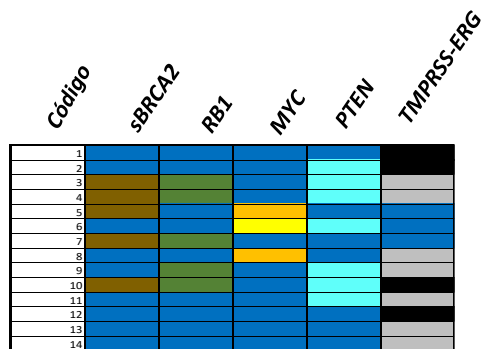


Tabla 6. Clasificación molecular realizada por FISH de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* (arriba), no portadores de mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2* (izquierda) y portadores de mutaciones germinales en *BRCA1* (abajo).



RESULTADOS

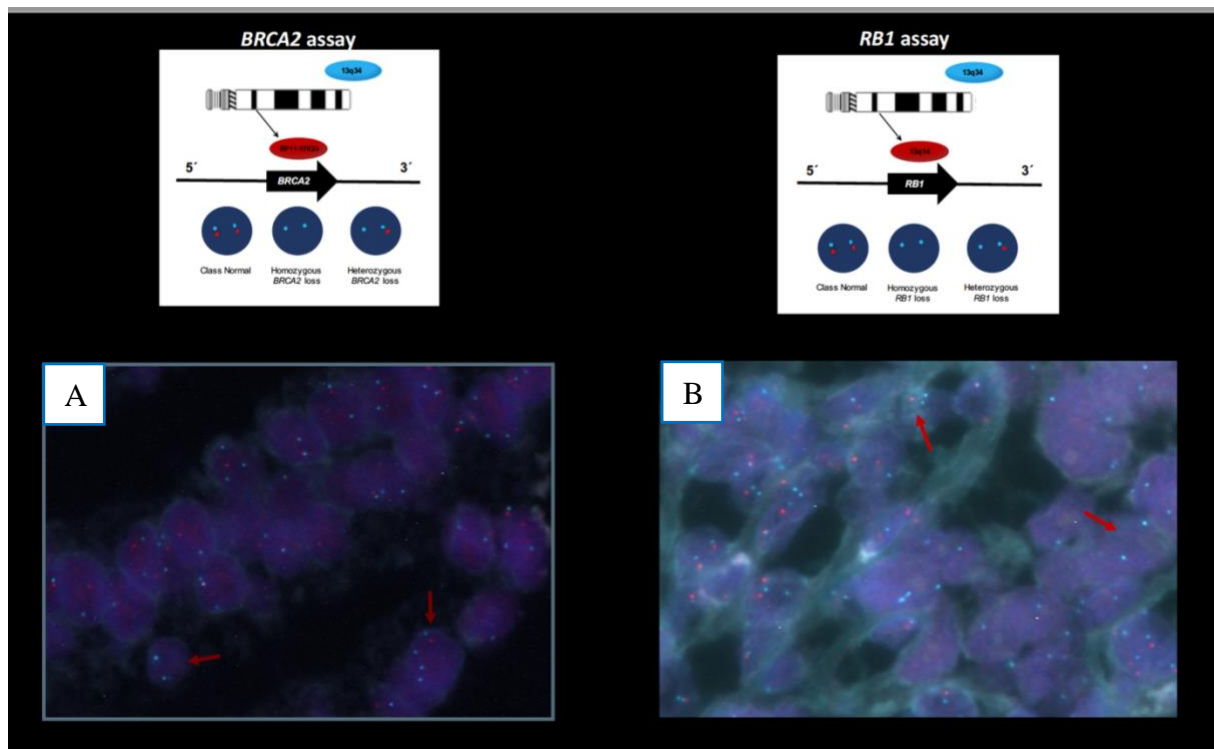


Figura 14. A) Imagen FISH de la pérdida *sBRCA2*, flecha izquierda pérdida homocigota, flecha derecha pérdida heterocigota. B) Imagen FISH de la pérdida *sRB1*, flecha izquierda pérdida heterocigota, flecha derecha pérdida homocigota.

5.5 VALIDACIÓN PRONÓSTICA DE MUTACIONES GERMINALES BRCA2

Tras una mediana de seguimiento de 13,4 años con un IC 95% (11,0-15,9) en los 214 pacientes elegibles para análisis de SCE y SLRC, se observaron 86 muertes cáncer específicas y 87 progresiones a enfermedad resistente a la castración^[223]. En el caso de los pacientes no metastásicos al diagnóstico, N=161 (75,2% del total) tras una mediana de seguimiento de 16,3 años, se observaron 48 individuos con progresión metastásica (29,8% de los pacientes no metastásicos al diagnóstico).

5.5.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Entre los 127 pacientes no portadores analizados se observaron 45 eventos para SCE, 35 eventos entre los 73 portadores *gBRCA2* y 7 eventos entre los 14 portadores *gBRCA1*.

La mediana de SCE desde el diagnóstico de CaPr se redujo de 17,6 años, IC 95% (11,0-24,2) en pacientes no portadores, a 9,1 años, IC 95% (7,9-10,4) en pacientes con mutaciones *gBRCA2*, evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa, $p=0,002$; HR, 2,10; IC 95% (1,33-3,33).

La SCE en pacientes portadores de *gBRCA1* fue de 13,5 años, IC 95% (3,7-23,2), sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas respecto a la de los no portadores, $p=0,136$; HR, 1,84; IC 95% (0,83-4,10), (Figura 15).

RESULTADOS

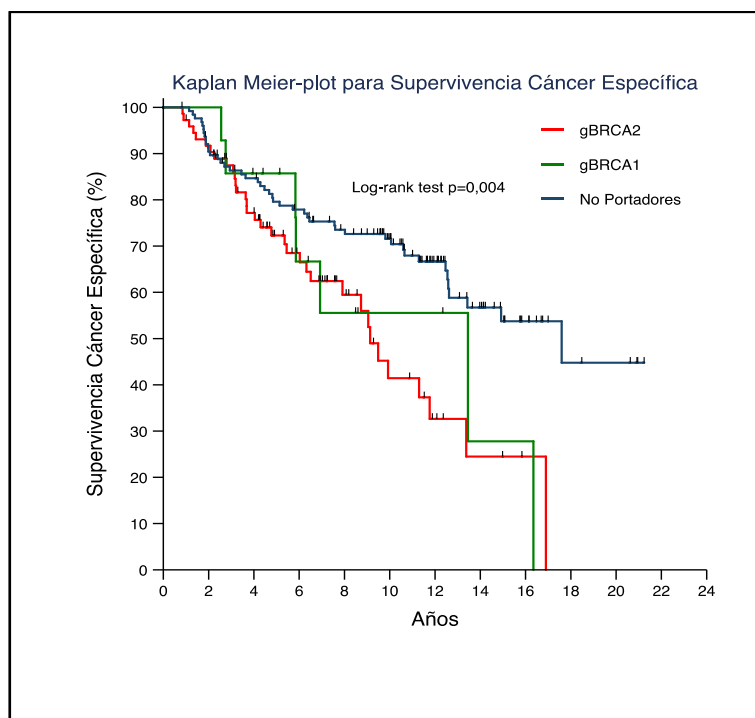


Figura 15. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes portadores de mutación *gBRCA2*, *gBRCA1* y no portadores.

5.5.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Se observaron 46 eventos para SLRC entre los 127 pacientes no portadores, 35 eventos entre los 73 portadores *gBRCA2* y 6 eventos entre los portadores *gBRCA1*. La mediana de SLRC desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con mutaciones *gBRCA2* fue de 8,8 años, IC 95% (4,4-15,5) sin alcanzarse la mediana de SLRC en pacientes no portadores, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,005$; HR, 1,91; IC 95% (1,22-3,00).

La SLRC en pacientes portadores *gBRCA1* fue de 9,0 años, IC 95% (4,1-no alcanzado, NA), sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas respecto a la de los no portadores, $p=0,224$; HR, 1,71; IC 95% (0,72-4,03), (Figura 16).

RESULTADOS

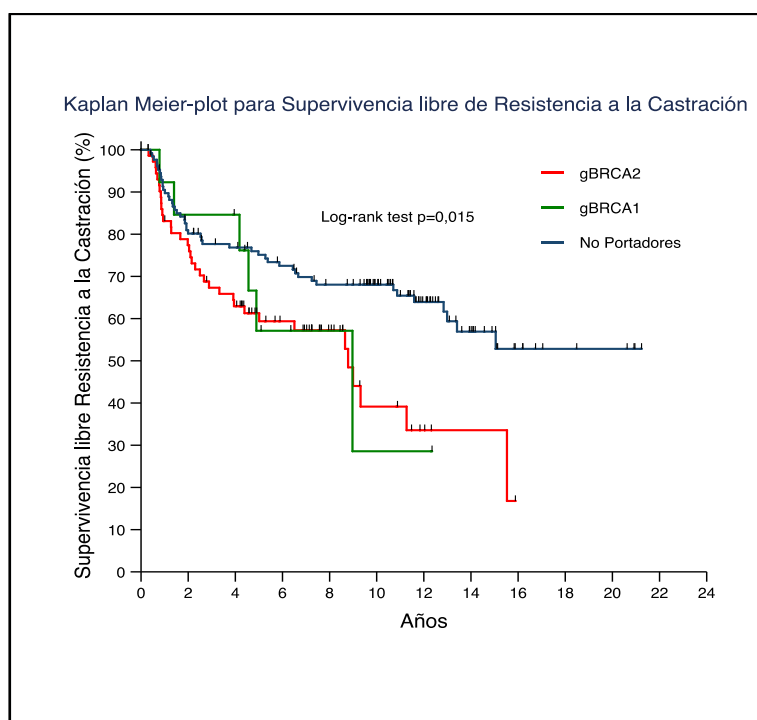


Figura 16. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes portadores de mutación *gBRCA2*, *gBRCA1* y no portadores.

5.5.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 161 pacientes (excluyéndose 53 pacientes metastásicos al diagnóstico), observándose 22 eventos entre los 99 no portadores, 23 eventos entre los 52 portadores *gBRCA2* restantes y 3 eventos entre los 10 portadores *gBRCA1*. Se analizó la mediana de SLPM desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con mutaciones *gBRCA2* siendo de 8,8 años, IC 95% (8,4-13,5) sin alcanzarse la mediana de SLPM en pacientes no portadores, apreciándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 4,16; IC 95% (2,23-7,75).

La SLPM en pacientes portadores *gBRCA1* fue de 9,5 años, IC 95% (4,3-NA), sin apreciarse diferencias significativas respecto a la de los no portadores, $p = 0,279$; HR, 1,96; IC 95% (0,58-6,59), (Figura 17).

RESULTADOS

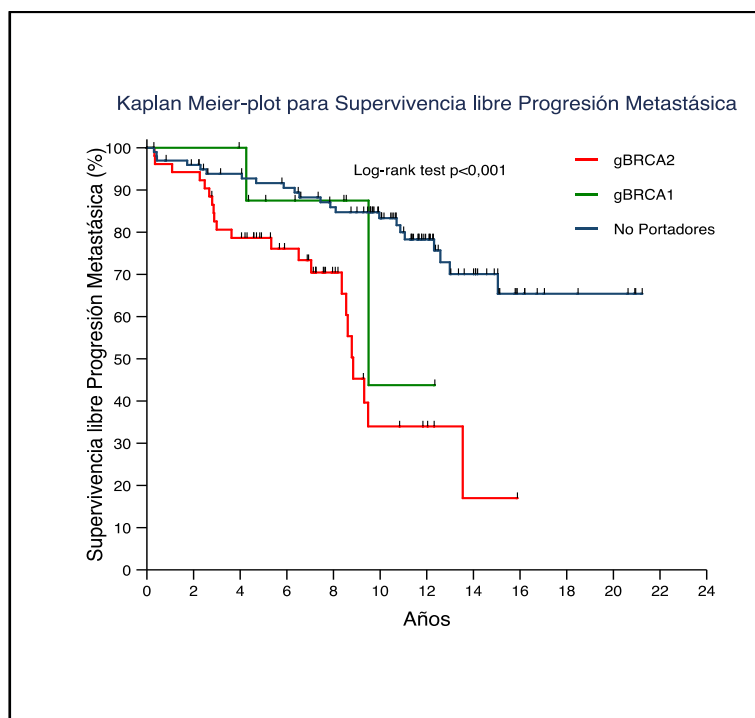


Figura 17. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes portadores de mutación *gBRCA2*, *gBRCA1* y no portadores.

5.6 VALIDACIÓN PRONÓSTICA DE ALTERACIONES SOMÁTICAS

5.6.1 *RB1*

En el estudio realizado mediante FISH en nuestra serie, se obtuvieron resultados del estatus de *RB1*, en la región cromosómica 13q14 en todos los pacientes analizados con bloque tumoral de parafina disponible (N=214).

Entre los hallazgos observados podemos describir una pérdida bialélica de *RB1* en 18 sujetos, una pérdida monoalélica de *RB1* en 54 pacientes, sin observar alteraciones de *RB1* en los 142 pacientes restantes, al analizar en profundidad los pacientes con pérdida bialélica de *RB1* se evidenciaron 13 pacientes (72,2%) que pertenecían al grupo de pacientes con mutaciones *gBRCA2*, entre los individuos con pérdida monoalélica 25 pacientes (44,6%) eran portadores de mutaciones *gBRCA2*.

5.6.1.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se observaron 50 eventos para SCE entre los 142 pacientes sin alteraciones a nivel de *RB1*, 7 eventos entre los 18 pacientes con pérdida bialélica y 29 eventos entre los 54 pacientes con pérdida monoalélica de *RB1*.

La mediana de SCE desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con pérdida bialélica de *RB1* fue de 11,3 años, IC 95% (3,8-18,8), en pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* de 9,9 años, IC 95% (9,1-10,8) y en no portadores de alteraciones a nivel de *RB1* de 16,3 años, IC 95% (12,4-20,3), sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas a nivel comparativo entre los pacientes con pérdida monoalélica y los pacientes con pérdidas bialélica, $p=0,117$; HR, 1,89; IC 95% (0,85-4,19). No obstante, se evidenciaron diferencias para SCE entre los pacientes con pérdida bialélica de *RB1* y los no portadores de mutaciones en *RB1*, $p<0,001$; HR, 3,24; IC 95% (1,86-5,66) y entre los pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* y los no portadores de dicha alteración, $p=0,001$; HR, 2,25; IC 95% (1,37-3,70), (Figura 18).

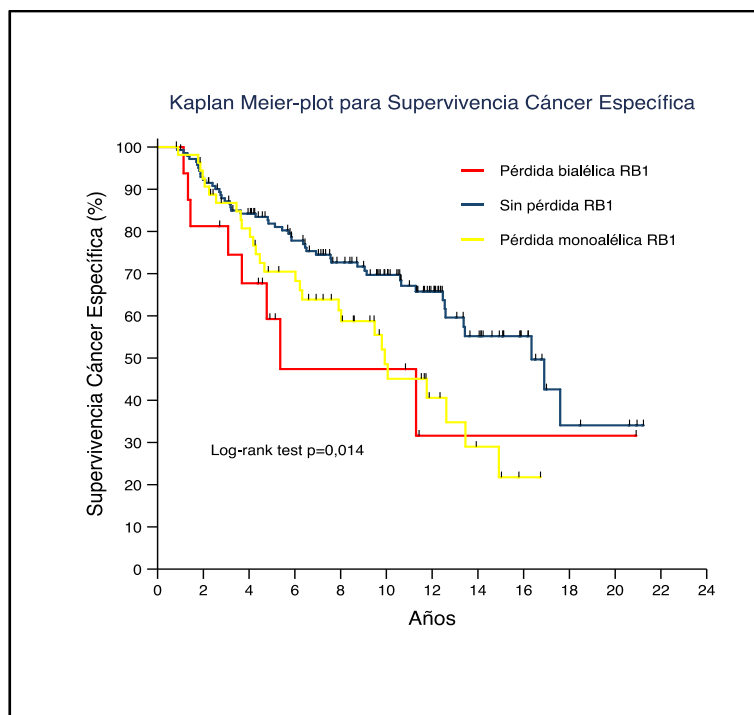


Figura 18. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida *RB1*.

En términos generales, se observaron 36 eventos entre los 72 pacientes con alteraciones a nivel de *RB1* y 50 eventos entre los individuos sin alteraciones en *RB1*.

La SCE de los pacientes con *RB1* íntegro fue de 16,9 años, IC 95% (12,0-21,8), significativamente mejor que la de los pacientes portadores de pérdida de *RB1*, siendo en estos 9,9 años, IC 95% (7,7-12,2), $p=0,004$; HR, 1,89; IC 95% (1,23-2,90).

5.6.1.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Respecto a la SLRC, se evidenciaron 51 eventos entre los 142 pacientes sin alteraciones a nivel de *RB1*, 7 eventos entre los 18 pacientes con pérdida bialélica y 29 eventos entre los 54 pacientes con pérdida monoalélica.

La mediana de SLRC desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con pérdida bialélica de *RB1* fue de 8,7 años, IC 95% (NA-18,9), en pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* de 9 años, IC 95% (5,5-12,5) y en no portadores de alteraciones a nivel de *RB1* de 15,5 años, IC 95% (13-NA). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para SLRC entre los pacientes con pérdida bialélica de *RB1* y los no portadores de mutaciones en *RB1*, $p<0,001$; HR, 3,41; IC 95% (1,97-5,90) y entre los pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* y los no portadores de dicha alteración, $p=0,011$; HR, 1,92; IC 95% (1,16-3,18).

5.6.1.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 161 pacientes no metastásicos de inicio, observándose 24 eventos entre los 110 no portadores de alteraciones en *RB1*, 21 eventos entre los 42 portadores de pérdidas monoalélicas y 3 eventos entre los 9 portadores de pérdidas bialélicas de *RB1*.

No se alcanzó la mediana de SLPM desde el diagnóstico para pérdida bialélica de *RB1*, en pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* fue 9,5 años, IC 95% (8,1-13,5) y en pacientes sin pérdida de *RB1* tampoco se alcanzó la mediana para SLPM. Se identificaron diferencias estadísticamente significativas para SLPM entre los pacientes con pérdida bialélica de *RB1* y los no portadores de mutaciones en *RB1*, $p<0,001$; HR, 6,28; IC 95% (2,87-13,73) y entre los

pacientes con pérdida monoalélica de *RB1* y los no portadores de dicha alteración, $p < 0,001$; HR, 5,79 IC 95% (2,91-11,55).

5.6.2 *BRCA2*

Se llevó a cabo un análisis de alteraciones a nivel somático en *BRCA2*, en la región cromosómica 13q13, mediante FISH a partir de las muestras parafinadas de los 214 pacientes descritos anteriormente. En 162 pacientes no se describieron alteraciones *sBRCA2* mediante FISH, evidenciándose una pérdida *sBRCA2* en 52 sujetos, 35 pérdidas bialélicas y 17 monoalélicas, 32 de los 52 pacientes en los que se identificó una pérdida *sBRCA2* presentaban mutaciones *gBRCA2*, 4 pérdidas bialélicas y 28 monoalélicas.

Considerando las mutaciones germinales que afectan a uno de los dos alelos de *BRCA2* en el conjunto del tamaño muestral, se observó una pérdida bialélica de *BRCA2* en 35 sujetos, una pérdida monoalélica de *BRCA2* en 58 pacientes, sin observar alteraciones en *BRCA2* en los 121 pacientes restantes.

5.6.2.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se analizaron 38 eventos para SCE entre los 121 pacientes sin alteraciones a nivel de *BRCA2*, 20 eventos entre los 35 pacientes con pérdida bialélica y 28 eventos entre los 58 pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2*.

La mediana de SCE desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2* fue de 6,3 años, IC 95% (1,7-10,9), en pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* de 11,3 años, IC 95% (7,9-14,7), sin alcanzarse la mediana de SCE para los no portadores de alteraciones. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a nivel comparativo entre los pacientes con pérdida monoalélica y los pacientes con pérdidas bialélica, $p = 0,189$; HR, 1,48; IC 95% (0,83-2,65). Sin embargo, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para SCE entre los pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2* y los no portadores de mutaciones en *BRCA2*, $p < 0,001$; HR, 2,71; IC 95% (1,86-4,60) y entre los pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* y los no portadores de dicha alteración, $p = 0,006$; HR, 2,48; IC 95% (1,29-4,76).

RESULTADOS

En el análisis exclusivamente somático mediante FISH de *BRCA2*, se observaron 31 eventos entre los 52 pacientes con alteraciones a nivel *sBRCA2* y 55 eventos entre los 162 individuos sin alteraciones *sBRCA2*. La SCE de los pacientes con pérdida *sBRCA2* fue de 9,0 años, IC 95% (5,2-12,9), significativamente más corta que la de los pacientes sin pérdida *sBRCA2*, siendo en estos 16,9 años, IC 95% (12,5-21,3), $p < 0,001$; HR, 2,62; IC 95% (1,67-4,10), (Figura 19).

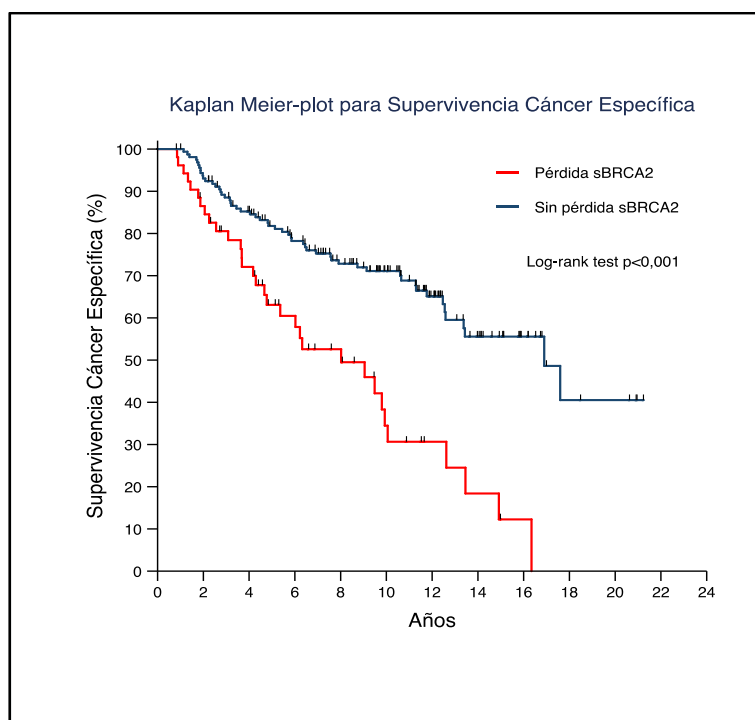


Figura 19. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida *sBRCA2*.

5.6.2.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

En relación a la SLRC, se evidenciaron 40 eventos entre los 121 pacientes sin alteraciones a nivel de *BRCA2*, 26 eventos entre los 58 pacientes con pérdida monoalélica y 21 eventos entre los 35 pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2*.

La mediana de SLRC desde el diagnóstico de CaPr en pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2* fue de 4,38 años, IC 95% (1,3-7,4), en pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* de 9 años, IC 95% (8,5-9,4), sin alcanzarse la mediana de SLRC para los no portadores de alteraciones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para SLRC entre los pacientes con

pérdida bialélica de *BRCA2* y los no portadores de mutaciones en *BRCA2*, $p < 0,001$; HR, 2,99; IC 95% (1,79-5,02) y entre los pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* y los no portadores de dicha alteración, $p = 0,015$; HR, 2,33; IC 95% (1,18-4,60).

En el análisis somático mediante FISH de *BRCA2*, se observaron 31 eventos entre los 52 pacientes con alteraciones a nivel *sBRCA2* y 56 eventos entre los 162 individuos sin alteraciones *sBRCA2*. La SLRC de los pacientes con pérdida *sBRCA2* fue de 5,0 años, IC 95% (2,1-7,9), significativamente inferior que la de los pacientes sin pérdida *sBRCA2*, quienes no alcanzaron la mediana de SLRC, $p < 0,001$; HR, 2,74; IC 95% (1,74-4,31).

5.6.2.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Entre los 161 pacientes no metastásicos de inicio, se observaron 16 eventos entre los 95 no portadores de alteraciones en *BRCA2*, 20 eventos entre los 44 portadores de pérdidas monoalélicas y 11 eventos entre los 22 portadores de pérdidas bialélicas de *BRCA2*.

No se alcanzó la mediana de SLPM desde el diagnóstico para pacientes sin alteraciones somáticas de *BRCA2*, en pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* fue 8,8 años, IC 95% (7,4-10,2) y en pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2* fue 8,8 años, IC 95% (7,8-9,8). La SLPM fue significativamente inferior en los pacientes con pérdida bialélica de *BRCA2* respecto a los no portadores de alteraciones a dicho nivel, $p < 0,001$; HR, 3,82; IC 95% (1,89-7,73) y entre los pacientes con pérdida monoalélica de *BRCA2* y los no portadores de dicha alteración, $p < 0,001$; HR, 4,53; IC 95% (1,95-10,50).

En el análisis mediante FISH exclusivamente somático de *BRCA2*, se observaron 18 eventos entre los 34 pacientes con alteraciones a nivel *sBRCA2* y 29 eventos entre los 127 individuos sin alteraciones *sBRCA2*. La SLPM de los pacientes con pérdida *sBRCA2* fue de 8,8 años, IC 95% (7,5-10,2), significativamente más corta que la de los pacientes sin pérdida *sBRCA2*, quienes no alcanzaron la mediana para SLPM, $p < 0,001$; HR, 4,06; IC 95% (2,23-7,41).

5.6.3 AMPLIFICACIÓN MYC

Se procedió a realizar la determinación de *MYC* mediante FISH, en la región cromosómica 8q24, sobre las 214 muestras tumorales parafinadas disponibles, obteniéndose resultados en 212 de ellas, con 49 pacientes en los que se describió amplificación de *MYC*, 17 pacientes ganancia de *MYC* y 146 individuos sin alteraciones a dicho nivel.

5.6.3.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se observaron 41 eventos para SCE entre los 146 pacientes sin alteraciones a nivel de *MYC*, 34 eventos entre los 49 pacientes con amplificación de *MYC* y 11 eventos entre los 17 pacientes con ganancia de *MYC*.

La mediana de SCE en pacientes con amplificación de *MYC* fue de 6 años, IC 95% (4,1-7,9), en pacientes con ganancia de *MYC* de 12,5 años, IC 95% (2,1-23,0) y en pacientes sin dichas alteraciones de 17,6 años, IC 95% (NA-NA). Describiéndose diferencias estadísticamente significativas, con una SCE más corta en los pacientes con amplificación de *MYC* respecto a los pacientes sin alteraciones, $p < 0,001$; HR, 5,25; IC 95%, (3,25-8,50), (Figura 20) y entre los pacientes con ganancia de *MYC* y los no portadores de dichas alteraciones, $p < 0,001$; HR, 2,56; IC 95% (1,31-5,00).

RESULTADOS

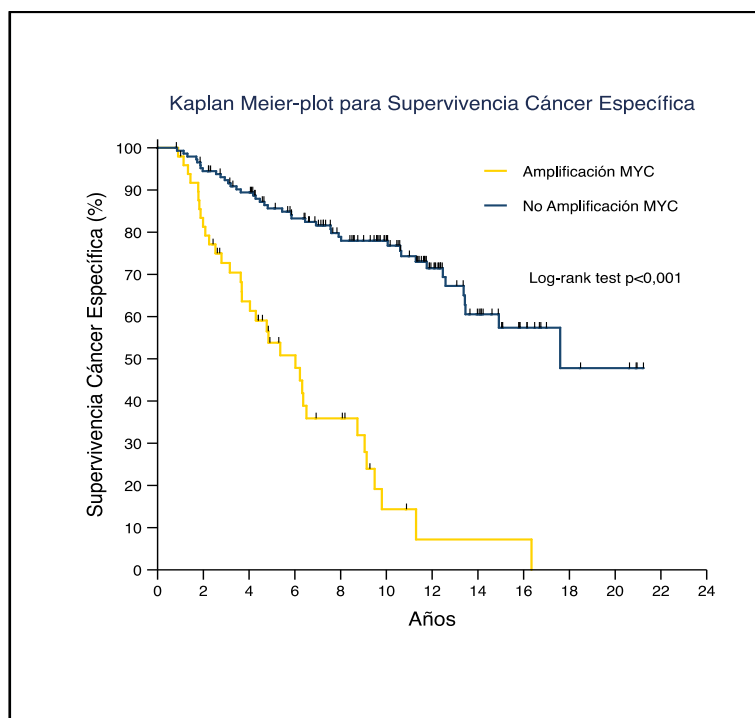


Figura 20. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con amplificación de *MYC*.

5.6.3.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Se describió la SLRC, evidenciándose 43 eventos entre los 146 pacientes sin alteraciones a nivel de *MYC*, 32 eventos entre los 49 pacientes con amplificación de *MYC* y 12 eventos entre los 17 pacientes con ganancia de *MYC*.

La mediana de SLRC en individuos con amplificación de *MYC* fue de 2,8 años, IC 95% (0,9-4,8), en pacientes con ganancia de *MYC* fue de 10,7 años, IC 95% (NA-22,3), sin alcanzarse la mediana para SLRC en pacientes sin dichas alteraciones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con una SLRC más corta en los pacientes con amplificación de *MYC* respecto a los pacientes sin alteraciones, $p < 0,001$; HR, 4,78; IC 95% (2,95-7,76) y entre los pacientes con ganancia de *MYC* y los no portadores de dichas alteraciones, $p = 0,002$; HR, 2,79; IC 95% (1,47-5,30).

5.6.3.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

En relación a la SLPM, se observaron 27 eventos entre los 121 no portadores de alteraciones en *MYC*, 15 eventos entre los 27 individuos con amplificación en *MYC* y 6 eventos entre los 11 pacientes con ganancia de *MYC*.

No se alcanzó la mediana de SLPM para pacientes sin alteraciones en *MYC*, en individuos con amplificación de *MYC* fue de 8,8 años, IC 95% (6,1-11,6), en pacientes con ganancia de *MYC* fue de 10,7 años, IC 95% (9,0-12,4). La SLPM fue significativamente inferior en los pacientes con amplificación de *MYC* respecto a los no portadores de alteraciones a dicho nivel, $p < 0,001$; HR, 4,83; IC 95% (2,51-9,31) y entre los pacientes con ganancia de *MYC* y los no portadores de dicha alteración, $p = 0,040$; HR, 2,53; IC 95% (1,04-6,14).

5.6.4 *PTEN*

Se llevó a cabo el análisis de *PTEN* mediante FISH, en la región cromosómica 10q23, sobre las 214 muestras tumorales parafinadas disponibles, obteniéndose resultados en 212 de ellas, encontrando 66 tumores con pérdida de *PTEN* y 146 muestras sin alteraciones.

5.6.4.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se observaron 53 eventos para SCE entre los 146 pacientes sin alteraciones en *PTEN* y 33 eventos entre los 66 individuos con pérdida de *PTEN*.

La mediana de SCE en pacientes con pérdida de *PTEN* fue de 11,3 años, IC 95% (8,2-14,4) y en pacientes sin dichas alteraciones de 16,3 años, IC 95% (12,9-19,8). No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p = 0,120$; HR, 1,41; IC 95% (0,91-2,18), (Figura 21).

RESULTADOS

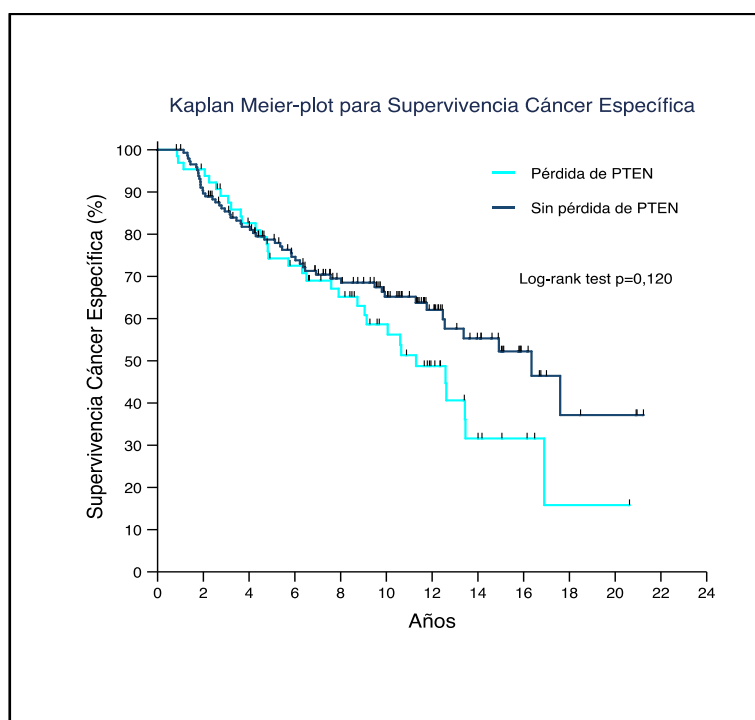


Figura 21. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con pérdida de *PTEN*.

5.6.4.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Respecto a la SLRC, se observaron 54 eventos para SCE entre los 146 pacientes sin alteraciones en *PTEN* y 33 eventos entre los 66 individuos con pérdida de *PTEN*.

La mediana de SLRC en pacientes con pérdida de *PTEN* fue de 10,7 años, IC 95% (6,0-15,4) y en pacientes sin dichas alteraciones de 15 años, IC 95% (NA-NA). No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,085$; HR, 1,46; IC 95% (0,95-2,26).

5.6.4.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Al analizar la SLPM, se observaron 28 eventos entre los 109 no portadores de alteraciones en *PTEN* y 20 eventos entre los 50 individuos con pérdida de *PTEN*.

La mediana de SLPM en pacientes con pérdida de *PTEN* fue de 12,6 años, IC 95% (10,2-15,0) sin alcanzarse la mediana en pacientes sin dichas alteraciones. No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,052$; HR, 1,77; IC 95% (0,99-3,15).

5.6.5 REORDENAMIENTO *TMPRSS-ERG*

Se llevó a cabo la determinación del reordenamiento *TMPRSS-ERG* mediante FISH, en la región cromosómica 21q22, sobre las 214 muestras tumorales parafinadas disponibles, obteniéndose resultados en 89 de ellas, encontrando 56 pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG* y 33 sin alteraciones a dicho nivel.

5.6.5.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se observaron 19 eventos para SCE entre los 56 pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG* y 10 eventos entre los 33 individuos sin reordenamiento *TMPRSS-ERG*.

La mediana de SCE en pacientes sin reordenamiento *TMPRSS-ERG* fue de 16,9 años, IC 95% (14,4-19,4) sin alcanzarse la mediana en pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG*. No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,508$; HR, 1,30; IC 95% (0,60-2,81), (Figura 22).

RESULTADOS

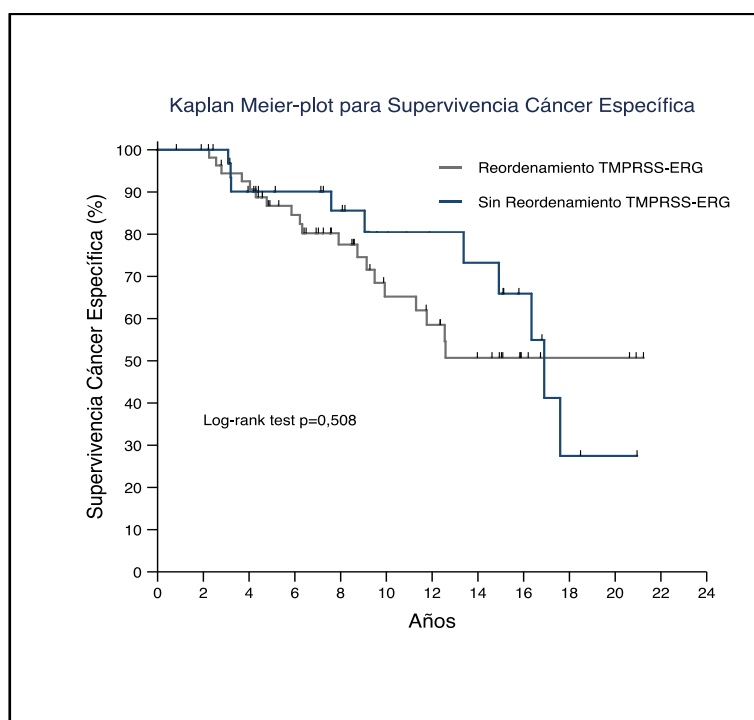


Figura 22. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG*.

5.6.5.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Se observaron 17 eventos para SLRC entre los 56 pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG* y 11 eventos entre los 33 individuos sin reordenamiento *TMPRSS-ERG*.

La mediana de SLRC en pacientes sin reordenamiento *TMPRSS-ERG* fue de 15 años, IC 95% (11,8-18,3) sin alcanzarse la mediana en pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG*. No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,786$; HR, 0,90; IC 95% (0,42-1,92).

5.6.5.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se observaron 19 eventos para SLPM entre los 52 pacientes con reordenamiento *TMPRSS-ERG* y 8 eventos entre los 29 individuos sin reordenamiento *TMPRSS-ERG*.

La mediana de SLPM en pacientes sin reordenamiento *TMPRSS-ERG* fue de 16,3 años, IC 95% (14,0-18,7) y en individuos con reordenamiento *TMPRSS-ERG* fue de 13,5 años, IC 95% (NA-

RESULTADOS

NA). No se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,392$; HR, 1,44; IC 95% (0,63-3,28).

5.7 CORRELACIÓN Y CONCORDANCIA

Dada la mayor frecuencia de pérdida somática de *BRCA2* y de *RB1* en los pacientes con alteraciones deletéreas en *BRCA2* a nivel de la línea germinal, y que ambos son genes en regiones próximas del brazo corto del cromosoma 13 (*13q*), hemos estudiado la correlación y concordancia de ambos eventos. Además, mediante la determinación del estado de la región subtelomérica *13q34* hemos estudiado la correlación de todos ellos con la pérdida completa del *13q*, ya que esta ya ha sido sugerida como un factor pronóstico en el CaPr^[224,225].

	<i>gBRCA2</i>	<i>gBRCA1</i>	<i>sBRCA2del</i>	<i>sRB1del</i>	<i>13q34del</i>
<i>gBRCA2</i>		0% $p=0,003$ $\kappa=-0,12$	44% $p<0,001$ $\kappa=0,32$	54% $p<0,001$ $\kappa=0,32$	37% $p=0,089$ $\kappa=0,14$
<i>gBRCA1</i>	0% $p=0,003$ $\kappa=-0,12$		36% $p=0,332$ $\kappa=0,06$	36% $p=1,000$ $\kappa=0,01$	13% $p=0,424$ $\kappa=-0,11$
<i>sBRCA2del</i>	61% $p<0,001$ $\kappa=0,32$	10% $p=0,332$ $\kappa=0,06$		96% $p<0,001$ $\kappa=0,74$	32% $p=0,990$ $\kappa<0,01$
<i>sRB1del</i>	55% $p<0,001$ $\kappa=0,32$	7% $p=1,000$ $\kappa=0,01$	70% $p<0,001$ $\kappa=0,74$		33% $p=0,604$ $\kappa<0,04$
<i>13q34del</i>	84% $p<0,001$ $\kappa=0,43$	4% $p=0,424$ $\kappa=-0,11$	64% $p=0,990$ $\kappa<0,01$	76% $p=0,604$ $\kappa<0,04$	

del delección
% Índice de correlación
p valor p de esa correlación
Kappa índice de concordancia

Tabla 7. Correlación y Concordancia entre alteraciones en *BRCA2*, *BRCA1*, *RB1* y *13q*.

Como muestra la Tabla 7 existen concordancias moderadas de la mutación germinal de *BRCA2*, la delección somática de *BRCA2* y *RB1*. De tal modo, en nuestra serie si un paciente tiene una mutación germinal de *BRCA2*, en el 44% de las ocasiones va a tener una pérdida somática del otro alelo de *BRCA2* (Kappa=0,32, $p < 0,001$) y un 54% de las ocasiones van a tener una pérdida de *RB1* (Kappa=0,32, $p < 0,001$). Aun más destacable en nuestra serie es la observación de que el 96% de los casos donde se detecta una pérdida somática de *BRCA2* se acompaña de pérdida de *RB1* ($p < 0,001$), mientras que la asociación es algo menor en el sentido contrario, pues un 70% de los tumores con pérdida somática de *RB1* se acompañan de delección somática de *BRCA2*, de hecho, la pérdida o integridad de ambas presenta una alta concordancia (Kappa=0,74). La altísima concordancia e índice de correlación entre ambas variables sugiere una alta probabilidad de co-linealidad, supuesto que si bien no verificamos por el método de inflación de la varianza (FIV) y los supuestos establecidos por Kleinbaum (FIV<10; $r^2 > 0,9$; Tolerancia <0,1) si se deducía del autovalor próximo a 0 del análisis de los componentes principales de las variables *BRCA2* y *RB1*. Para evitar este problema más adelante se diseñó una variable conjunta que representara los valores individual y conjunto de ambas (*BRCA2-RB1*). Por último, observamos concordancias moderadas, pero no significativas entre la pérdida de la región 13q34 y la delección de *BRCA2* y *RB1*

5.7.1 CO-DELECCIÓN *BRCA2-RB1*

Se llevó a cabo el análisis conjunto de los resultados obtenidos mediante FISH, para las alteraciones tanto a nivel *sBRCA2* como a nivel de *RB1*, obteniéndose resultados valorables en 214 pacientes.

5.7.1.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Se analizaron 48 eventos para SCE entre los 140 pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* o pérdida individualizada de *RB1* o *BRCA2*, 1 evento entre los 2 individuos que solo presentaron pérdida *sBRCA2*, 7 eventos entre los 21 pacientes que solo tenían alteración a nivel de *RB1* y 30 eventos entre los 51 pacientes con co-delección *BRCA2-RB1*.

RESULTADOS

La mediana de SCE en pacientes con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 8 años, IC 95% (4,8-10,1) y en pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* de 16,9 años, IC 95% (12,6-NA), identificándose una diferencia estadísticamente significativa $p < 0,001$; HR, 3,24; IC 95% (1,86-5,65), (Figura 23).

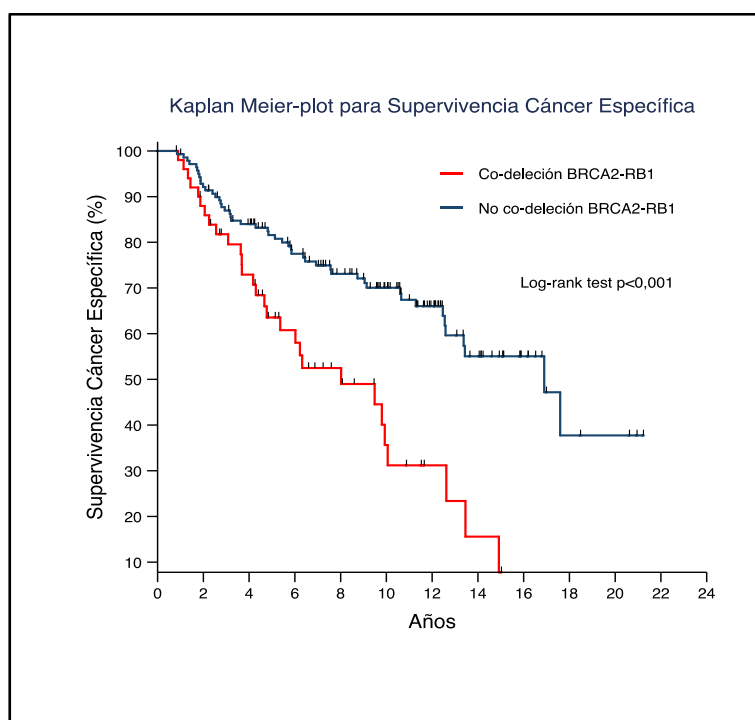


Figura 23. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con co-delección *BRCA2-RB1*.

5.7.1.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Se observaron 50 eventos para SLRC entre los 140 pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* o pérdida individualizada de *RB1* o *BRCA2*, ningún evento entre los 2 individuos que solo presentaron pérdida *sBRCA2*, 6 eventos entre los 21 pacientes que solo tenían alteración a nivel de *RB1* y 31 eventos entre los 51 pacientes con co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SLRC en pacientes con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 5 años, IC 95% (2,1-9,3) y en pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* o pérdida individualizada de *RB1* o *BRCA2* fue de 15,5 años, IC 95% (13-NA), identificándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 2,74; IC 95% (1,64-4,59).

5.7.1.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Observamos 22 eventos para SLPM entre los 107 pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* o pérdida individualizada de *RB1* o *BRCA2*, 1 evento entre los 2 individuos que solo presentaron pérdida *sBRCA2*, 7 eventos entre los 19 pacientes que solo tenían alteración a nivel de *RB1* y 17 eventos entre los 31 pacientes con co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SLPM en pacientes con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 9,3 años, IC 95% (4,7-10,7), sin alcanzarse la mediana de SLPM en pacientes sin co-delección *BRCA2-RB1* o pérdida individualizada de *RB1* o *BRCA2* e identificándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 5,53; IC 95% (2,66-11,52).

5.8 MODELOS PRONÓSTICOS INTEGRANDO MUTACIONES SOMÁTICAS Y GERMINALES EN PACIENTES CON Y SIN MUTACIONES EN *BRCA*

Se realizó un modelo multivariable, que introdujo todas las variables significativas identificadas en el análisis univariable, así como las variables de emparejamiento de este estudio de casos y controles.

5.8.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

El modelo multivariable para SCE identificó las mutaciones *gBRCA2*, $p=0,006$; HR, 3,79; IC 95% (1,46-9,87), la co-delección somática *BRCA2-RB1*, $p=0,003$; HR, 4,18; IC 95% (1,62-10,81) y la amplificación de *MYC*, $p=0,024$; HR, 2,38; IC 95% (1,12-5,07), como factores moleculares de pronóstico independientes. La puntuación de Gleason ≥ 8 respecto a la ≤ 7 , $p=0,002$; HR, 3,85; IC 95% (1,64-9,04) y el estadio metastásico en el momento del diagnóstico, $p<0,001$; HR, 15,1; IC 95% (5,49-41,52), también se asociaron de forma independiente con un SCE más corta, (Tabla 8).

SCE	p	HR	IC-95%	
			Inferior	Superior
<i>gBRCA1</i> vs No	0,669	1,32	0,37	4,69
<i>gBRCA2</i> vs No	0,006*	3,79	1,46	9,87
sRB1del vs No	0,946	0,95	0,20	4,41
<i>sBRCA2-RB1</i> co-del vs No	0,003*	4,18	1,62	10,81
Amplificación <i>MYC</i> vs No	0,024*	2,38	1,12	5,07
Ganancia <i>MYC</i> vs No	0,371	1,63	0,56	4,80
Gleason ≥ 8 vs ≤ 7	0,002*	3,85	1,64	9,04
PSA >Mediana vs \leq Mediana	0,717	1,15	0,54	2,44
T3/T4 vs T1/T2	0,676	0,85	0,41	1,79
N1 vs N0	0,566	1,34	0,49	3,67
M1 vs M0	<0,001*	15,10	5,49	41,52
>65 vs ≤ 65 años	0,382	1,02	0,98	1,06

Tabla 8. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia Cáncer Específica.

5.8.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

El modelo multivariable para SLRC identificó las mutaciones *gBRCA2*, $p=0,010$; HR, 3,57; IC 95% (1,35-9,44), la co-delección somática de *BRCA2-RB1*, $p=0,034$; HR, 2,75; IC 95% (1,08-6,98) y la amplificación de *MYC*, $p=0,050$; HR, 2,47; IC 95% (1,00-6,07), como factores moleculares de pronóstico independientes, La puntuación de Gleason ≥ 8 respecto a la ≤ 7 , $p=0,006$; HR, 3,09; IC 95% (1,39-6,86), el valor de PSA al diagnóstico por encima de la mediana frente al valor por debajo de la mediana, $p=0,046$; HR, 2,2; IC 95% (1,01-4,79) y el estadio metastásico en el momento del diagnóstico, $p<0,001$; HR, 14,3; IC 95% (5,28-38,74), también se asociaron de forma independiente con un SLRC más corta, (Tabla 9).

SLRC	p	HR	IC-95%	
			Inferior	Superior
<i>gBRCA1</i> vs No	0,057	3,61	0,96	13,54
<i>gBRCA2</i> vs No	0,010*	3,57	1,35	9,44
<i>sRB1del</i> vs No	0,728	0,76	0,16	3,59
<i>sBRCA2-RB1</i> co-del vs No	0,034*	2,75	1,08	6,98
Amplificación <i>MYC</i> vs No	0,050*	2,47	1,00	6,07
Ganancia <i>MYC</i> vs No	0,175	2,07	0,72	5,96
Gleason ≥ 8 vs ≤ 7	0,006*	3,09	1,39	6,86
PSA >Mediana vs \leqMediana	0,046*	2,20	1,01	4,79
T3/T4 vs T1/T2	0,505	0,77	0,36	1,66
N1 vs N0	0,494	0,67	0,21	2,12
M1 vs M0	<0,001*	14,30	5,28	38,74
>65 vs ≤ 65 años	0,525	0,99	0,95	1,03

Tabla 9. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia libre de Resistencia a la Castración.

5.8.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

El modelo multivariable para SLPM identificó las mutaciones *gBRCA2*, $p<0,001$; HR, 6,79; IC 95% (2,37-19,51) y la co-delección somática de *BRCA2-RB1*, $p<0,001$; HR, 6,7; IC 95% (2,43-18,49) como factores moleculares de pronóstico independientes. El estadio tumoral T3 / T4 frente T1 / T2, $p=0,028$; HR, 2,36; IC 95% (1,1-5,06) también se asoció de forma independiente con una SLPM más corta, (Tabla 10).

RESULTADOS

SLPM	p	HR	IC-95%	
			Inferior	Superior
<i>gBRCA1</i> vs No	0,958	1,04	0,28	3,86
<i>gBRCA2</i> vs No	<0,001*	6,79	2,37	19,51
<i>sRB1del</i> vs No	0,941	0,94	0,20	4,47
sBRCA2-RB1 co-del vs No	<0,001*	6,70	2,43	18,49
Amplificación <i>MYC</i> vs No	0,421	1,42	0,60	3,37
Ganancia <i>MYC</i> vs No	0,705	1,26	0,39	4,10
Gleason ≥ 8 vs ≤ 7	0,093	1,85	0,90	3,77
PSA >Mediana vs \leq Mediana	0,104	1,80	0,89	3,67
T3/T4 vs T1/T2	0,028*	2,36	1,10	5,06
N1 vs N0	0,512	0,65	0,18	2,34
M1 vs M0	No aplicable			
>65 vs ≤ 65 años	0,328	0,98	0,93	1,03

Tabla 10. Modelo pronóstico multivariable para Supervivencia libre de Progresión Metastásica.

5.9 CO-DELECCIÓN *BRCA2-RB1* Y AMPLIFICACIÓN *MYC*. ANÁLISIS POR SUBGRUPOS.

Se llevó a cabo la elaboración de un modelo pronóstico derivado del análisis multivariable, en dicho modelo se incluyeron las mutaciones *gBRCA2* y la co-delección *BRCA2-RB1*, ya que como se muestra en la sección anterior dichas variables fueron pronósticas para SCE, SLRC y SLPM, incluyendo también la amplificación de *MYC*, pronóstica para SCE y SLRC. Para simplificar la representación de los resultados y dado que uno de los objetivos secundarios de este estudio era la identificación de factores moleculares que modificaran el pronóstico de los tumores con mutaciones germinales en *BRCA2*, elegimos ver el efecto de los otros dos factores pronósticos independientes, tanto la co-delección *BRCA2-RB1* como la amplificación de *MYC*, mediante un análisis estratificado según la existencia o no de mutaciones germinales deletéreas en *BRCA2*.

Tras una mediana de seguimiento de 9,1 años, en los 73 pacientes con mutaciones *gBRCA2* elegibles para análisis de SCE y SLRC, se observaron 35 muertes cáncer específicas y 35 progresiones de enfermedad resistente a la castración. En el caso de los pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* no metastásicos al diagnóstico, N=52 (71,2% del total de portadores *gBRCA2*) tras una mediana de seguimiento de 8,8 años, se observaron 23 individuos con progresión metastásica (44,2%).

En pacientes no portadores de mutaciones *gBRCA2*, tras una mediana de seguimiento de 16,3 años, en los 141 pacientes analizados para SCE y SLRC, se observaron 52 muertes cáncer específicas y 52 progresiones de enfermedad resistente a la castración.

En el caso de los pacientes no portadores *gBRCA2* no metastásicos al diagnóstico, N=109 (67,7% del total de no portadores *gBRCA2*) tras una mediana de seguimiento de 16,8 años, se observaron 24 individuos con progresión metastásica (22,0%).

5.9.1 *gBRCA2* - CO-DELECIÓN *BRCA2-RB1*

5.9.1.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Entre los 73 pacientes portadores *gBRCA2* analizados se observaron 35 eventos para SCE, 17 eventos entre los 31 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 18 eventos entre los 42 no portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SCE para portadores de mutaciones *gBRCA2* sin co-delección *BRCA2-RB1* fue de 11,3 años, IC 95% (7,2-15,4) y en pacientes *gBRCA2* con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 6,3 años, IC 95% (2,3-10,6), evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa, $p=0,041$; HR, 1,75; IC 95% (1,32-3,57), (Figura 24).

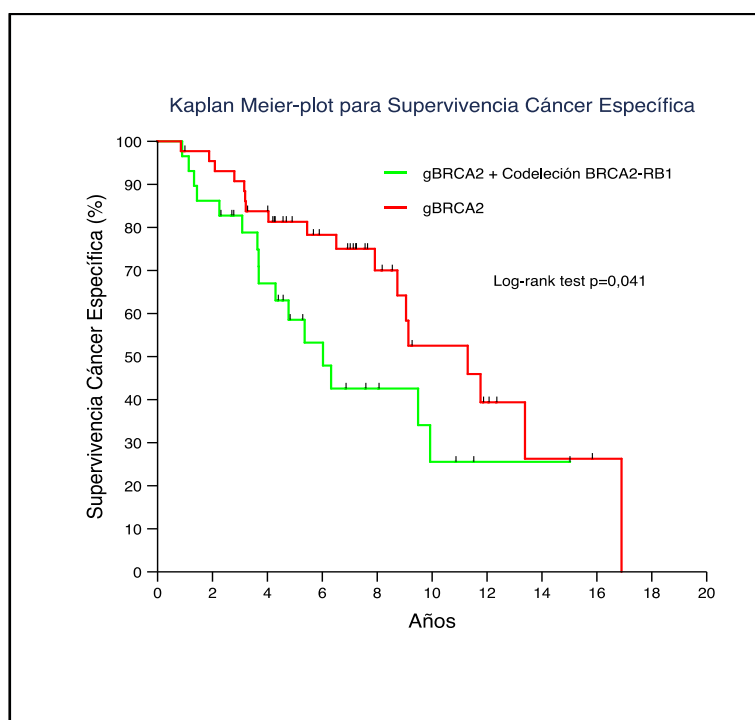


Figura 24. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin co-delección *BRCA2-RB1*.

5.9.1.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Entre los 73 pacientes portadores *gBRCA2* analizados se observaron 35 eventos para SLRC, 18 eventos entre los 31 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 17 eventos entre los 42 portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SLRC desde el diagnóstico para portadores de mutaciones *gBRCA2* sin co-delección *BRCA2-RB1* fue de 9 años (8,7-NA) y en pacientes *gBRCA2* con co-delección *BRCA2-RB1* de 3,9 años (1,7-11,3) observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,030$; HR, 1,82; IC 95% (1,45-3,57), (Figura 25).

RESULTADOS

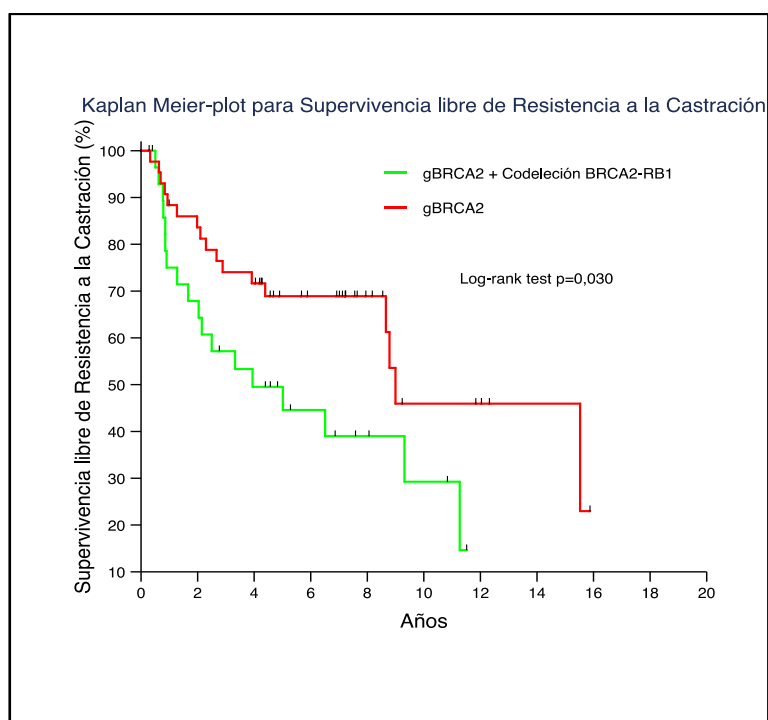


Figura 25. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin co-delección *BRCA2-RB1*.

5.9.1.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 52 pacientes portadores *gBRCA2*, observándose 23 eventos entre los 52 portadores de mutaciones *gBRCA2*. 9 eventos entre los 18 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 14 eventos entre los 34 no portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SLPM desde el diagnóstico para portadores de mutaciones *gBRCA2* sin co-delección de *BRCA2-RB1* fue de 8,8 años (8,4-NA) y en pacientes *gBRCA2* con co-delección de *BRCA2-RB1* de 8,5 años (3,6-NA), sin apreciarse diferencias significativas entre ambos grupos, $p=0,540$; HR, 1,33; IC 95% (0,52-3,45), (Figura 26).

RESULTADOS

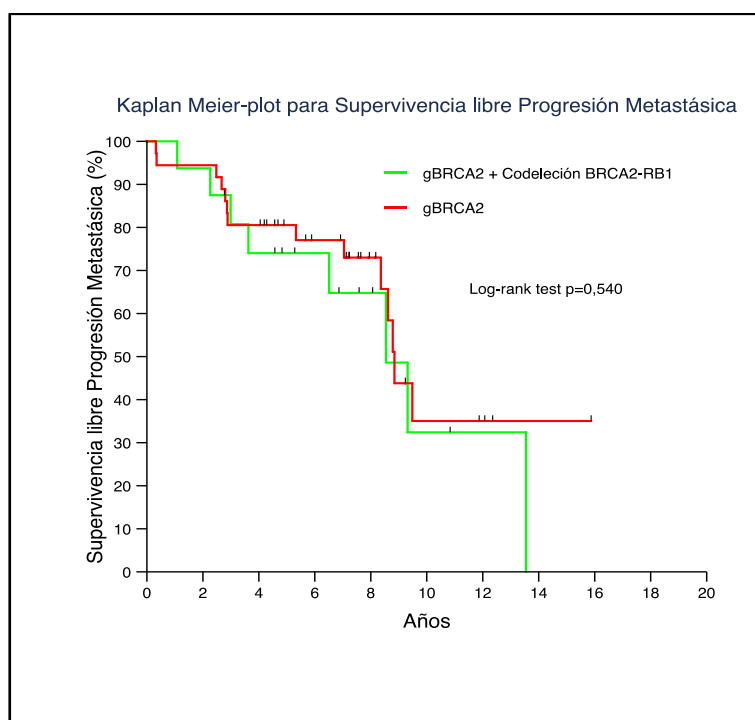


Figura 26. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin co-delección *BRCA2-RB1*.

5.9.2 NO *gBRCA2* - CO-DELECIÓN *BRCA2-RB1*

5.9.2.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Entre los 141 pacientes no portadores *gBRCA2* analizados se observaron 52 eventos para SCE, 13 eventos entre los 19 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 39 eventos entre los 122 no portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

La mediana de SCE desde el diagnóstico para no portadores *gBRCA2* sin co-delección *BRCA2-RB1* fue de 17,6 años, IC 95% (NA-NA) y en pacientes no portadores *gBRCA2* con co-delección *BRCA2-RB1* de 9,8 años, IC 95% (5,9-13,8), evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$; HR, 2,94; IC 95% (1,52-5,56), (Figura 27).

RESULTADOS

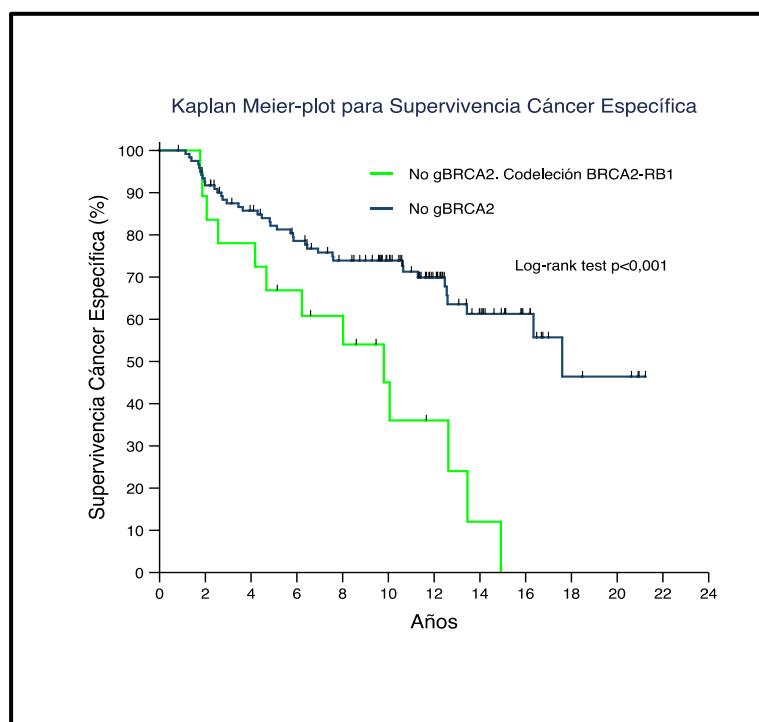


Figura 27. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin co-delección *BRCA2-RB1*.

5.9.2.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Entre los 141 pacientes no portadores *gBRCA2* analizados se observaron 52 eventos para SLRC, 12 eventos entre los 19 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 40 eventos entre los 122 no portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

No se alcanza la mediana de SLRC desde el diagnóstico para no portadores *gBRCA2* sin co-delección *BRCA2-RB1* y en pacientes no portadores *gBRCA2* con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 7,2 años, IC 95% (1,9-10,7), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,002$; HR, 2,78; IC 95% (1,43-5,56), (Figura 28).

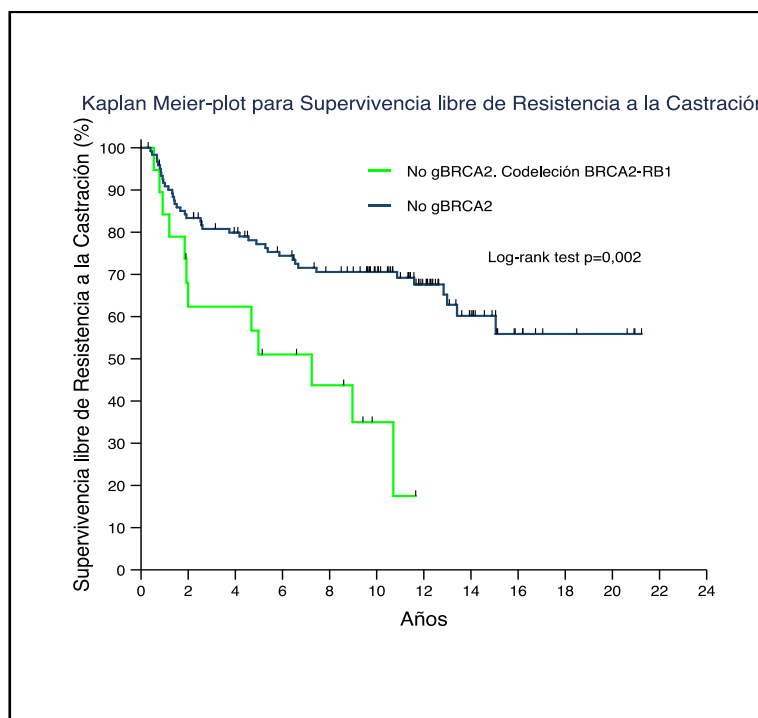


Figura 28. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin co-delección *BRCA2-RB1*.

5.9.2.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 109 pacientes no portadores *gBRCA2*, observándose 24 eventos entre los 109 no portadores de mutaciones *gBRCA2*. 8 eventos entre los 14 portadores de co-delección *BRCA2-RB1* y 16 eventos entre los 95 no portadores de co-delección *BRCA2-RB1*.

No se alcanza la mediana de SLPM desde el diagnóstico para no portadores *gBRCA2* sin co-delección *BRCA2-RB1* y en pacientes no portadores *gBRCA2* con co-delección *BRCA2-RB1* fue de 9,5 años, IC 95% (0,4-NA), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 8,33; IC 95% (3,33-20), (Figura 29).

RESULTADOS

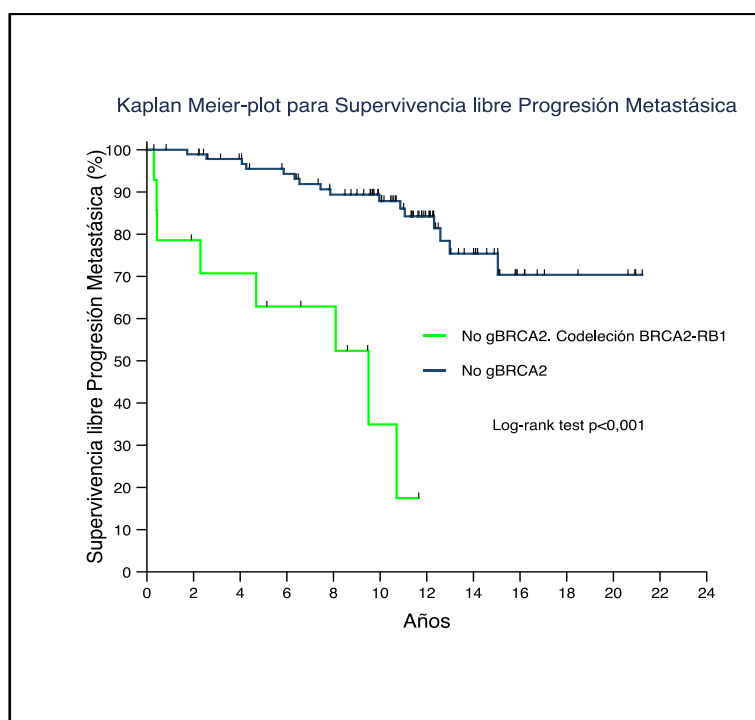


Figura 29. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin co-deleción *BRCA2-RB1*.

5.9.3 *gBRCA2*-AMPLIFICACIÓN *MYC*

5.9.3.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Entre los 73 pacientes portadores *gBRCA2* analizados, se observaron 35 eventos para SCE, 24 eventos entre los 35 pacientes con amplificación de *MYC* y 11 eventos entre los 38 individuos sin amplificación de *MYC*.

La mediana de SCE desde el diagnóstico para portadores *gBRCA2* sin amplificación de *MYC* fue de 13,4 años, IC 95% (10-16,8) y en pacientes portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* de 6,0 años, IC 95% (4,1-7,9), evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$; HR, 2,94; IC 95% (1,52-5,56), (Figura 30).

RESULTADOS

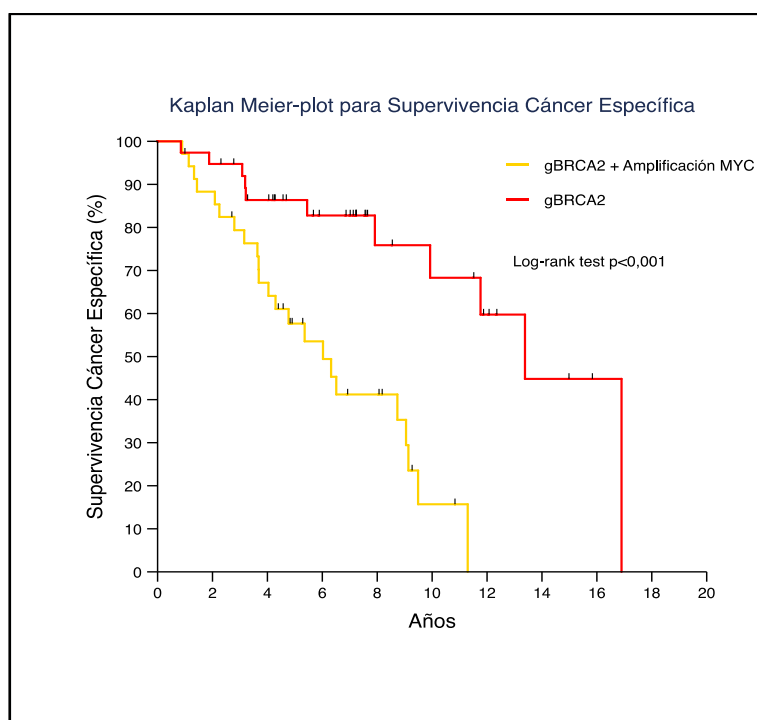


Figura 30. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

5.9.3.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Entre los 73 pacientes portadores *gBRCA2* analizados se observaron 35 eventos para SLRC, 23 eventos entre los 35 pacientes con amplificación de *MYC* y 12 eventos entre los 38 individuos sin amplificación de *MYC*.

La mediana de SLRC desde el diagnóstico para portadores *gBRCA2* sin amplificación de *MYC* fue de 15,5 años, IC 95% (8,8-NA) y en pacientes portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* de 3,3 años, IC 95% (1,7-8,7), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 3,85; IC 95% (1,79-7,69), (Figura 31).

RESULTADOS

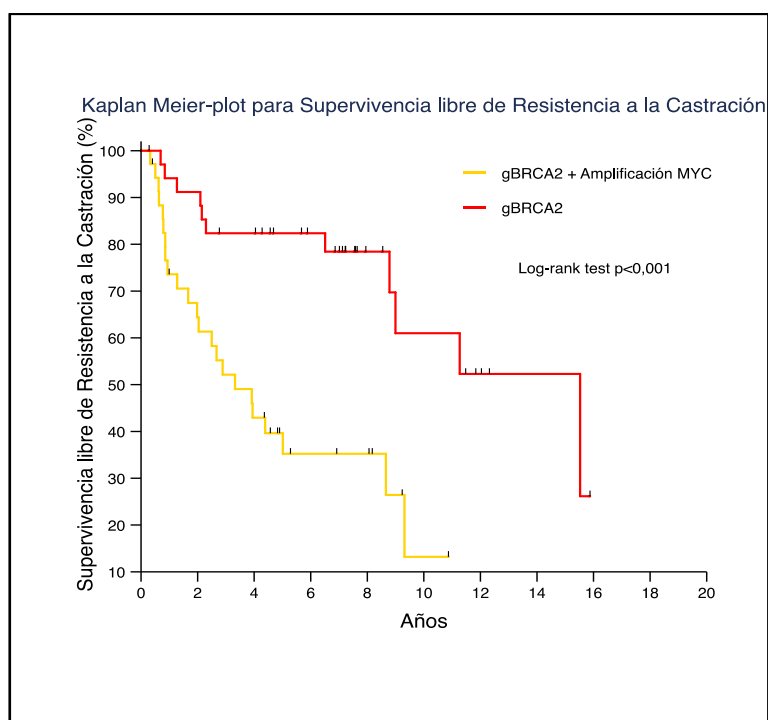


Figura 31. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

5.9.3.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 52 pacientes portadores *gBRCA2* para SLPM, observándose 23 eventos para SLPM, 12 eventos entre los 20 pacientes con amplificación de *MYC* y 11 eventos entre los 32 individuos sin amplificación de *MYC*.

La mediana de SLPM desde el diagnóstico para portadores *gBRCA2* sin amplificación fue de *MYC* de 8,8 años, IC 95% (8,4-NA) y en pacientes portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* de 6,3 años, IC 95% (2,1-10,6), sin apreciarse una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p=0,138$; HR, 1,89; IC 95% (0,82-4,54), (Figura 32).

RESULTADOS

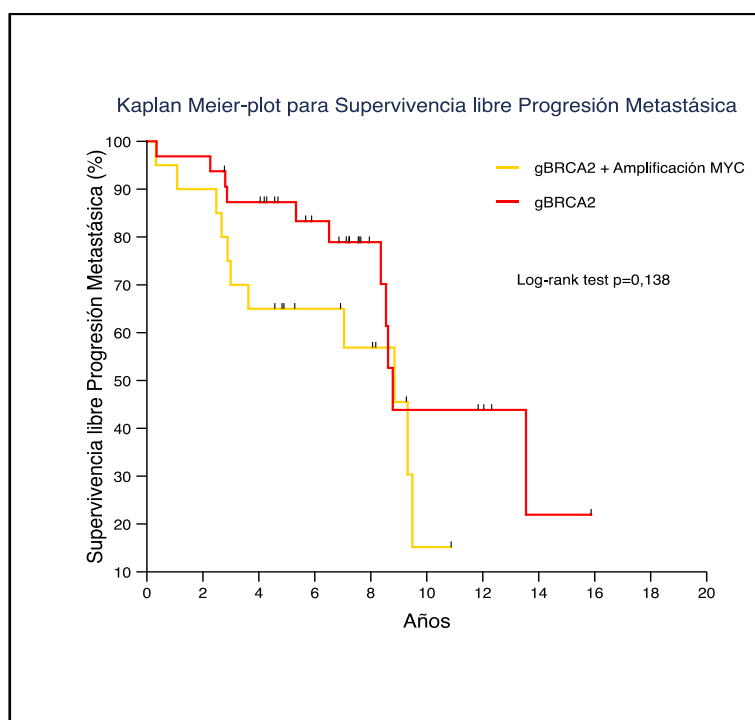


Figura 32. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes con mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

5.9.4 NO *gBRCA2*-AMPLIFICACIÓN *MYC*

5.9.4.1 SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

Entre los 141 pacientes no portadores *gBRCA2* analizados se observaron 52 eventos para SCE, 11 eventos entre los 14 pacientes con amplificación de *MYC* y 41 eventos entre los 127 individuos sin amplificación de *MYC*.

La mediana de SCE para no portadores de *gBRCA2* sin amplificación de *MYC* fue de 17,6 años, IC 95% (NA-NA) y en pacientes no portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* de 4,8 años, IC 95% (0,0-10,0), apreciándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 5,26; IC 95% (2,63-10,31), (Figura 33).

RESULTADOS

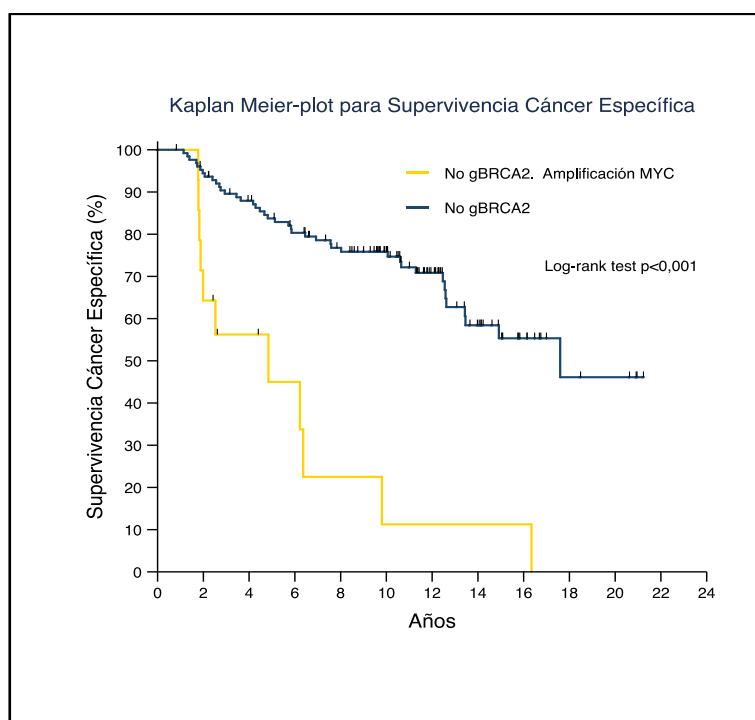


Figura 33. Supervivencia Cáncer Específica en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

5.9.4.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE RESISTENCIA A LA CASTRACIÓN

Entre los 141 pacientes no portadores *gBRCA2* analizados se observaron 52 eventos para SLRC, 9 eventos entre los 14 pacientes con amplificación de *MYC* y 43 eventos entre los 127 individuos sin amplificación de *MYC*.

No se alcanzó la mediana de SLRC para no portadores de *gBRCA2* sin amplificación de *MYC* y en pacientes no portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* fue de 1,5 años, IC 95% (0,8-NA), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 5,00; IC 95% (2,38-10,75), (Figura 34).

RESULTADOS

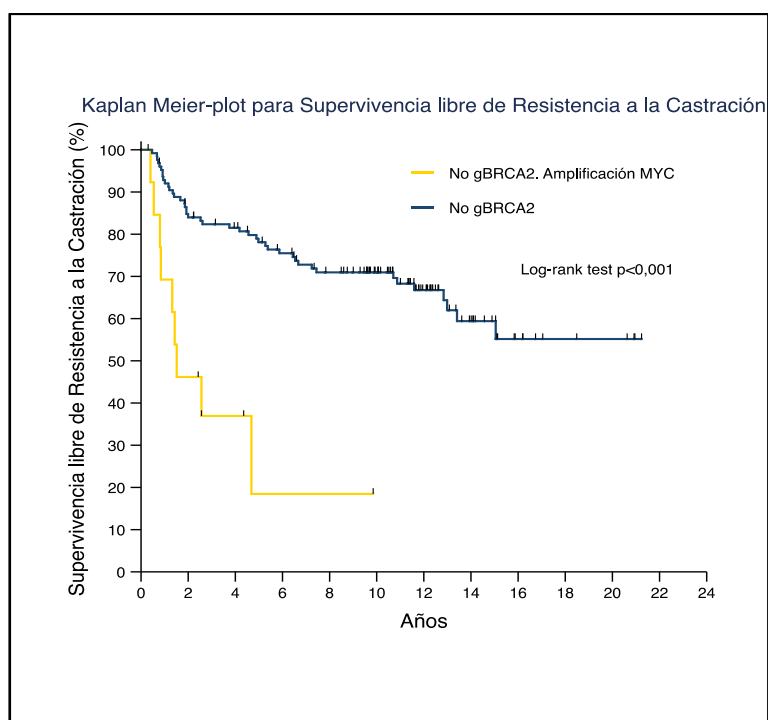


Figura 34. Supervivencia libre de Resistencia a la Castración en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

5.9.4.3 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN METASTÁSICA

Se analizaron 109 pacientes no portadores *gBRCA2*, observándose 24 eventos para SLPM entre los 109 no portadores de mutaciones *gBRCA2*. 3 eventos entre los 7 pacientes con amplificación de *MYC* y 21 eventos entre los 102 individuos sin amplificación de *MYC*.

No se alcanza la mediana de SLPM para no portadores de *gBRCA2* sin amplificación de *MYC* y en pacientes no portadores *gBRCA2* con amplificación de *MYC* fue de 4,7 años, IC 95% (2,6-NA), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, $p < 0,001$; HR, 7,81; IC 95% (2,11-28,57), (Figura 35).

RESULTADOS

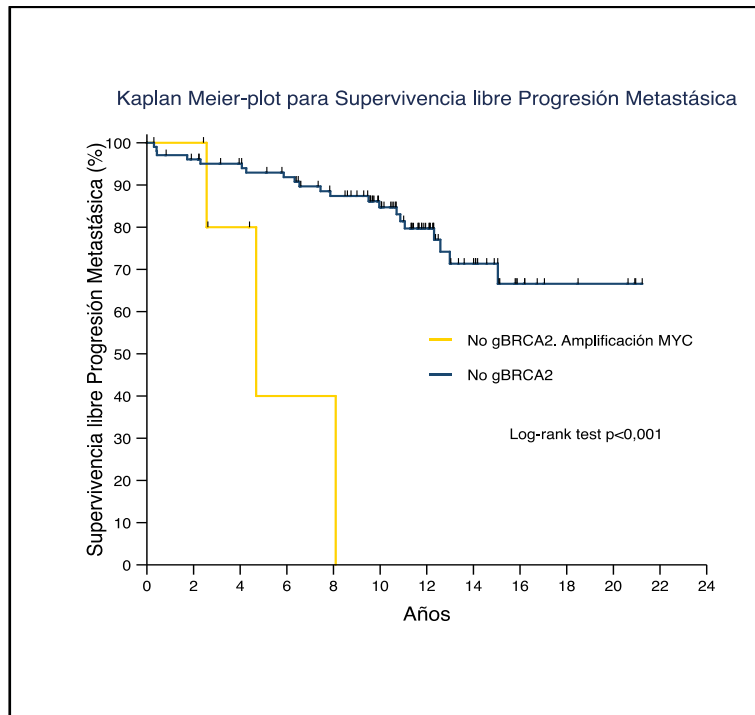


Figura 35. Supervivencia libre de Progresión Metastásica en pacientes sin mutaciones *gBRCA2* con y sin amplificación de *MYC*.

6 DISCUSIÓN

El análisis llevado a cabo en nuestra serie confirma que la presencia de las mutaciones *gBRCA2* en cáncer de próstata está asociado a un peor pronóstico en términos de supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica, respecto a aquellos pacientes no portadores de dichas mutaciones. Estos resultados confirman los ya descritos previamente considerándose el primer factor genético heredable que ha demostrado tener un impacto sobre el pronóstico del cáncer de próstata^[33,118–122]. Por otra parte, la co-delección somática de *BRCA2-RB1* y la amplificación de *MYC* identifican un subtipo letal de cáncer de próstata tanto en pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* como en no portadores.

6.1 RESULTADOS EN LA LÍNEA GERMINAL

En nuestro análisis la mediana de supervivencia cáncer específica desde el diagnóstico de cáncer de próstata en pacientes con mutaciones en *gBRCA2* fue de 9,1 años, reduciéndose en 8,5 años respecto a la mediana de los no portadores, ($p=0,002$; HR, 2,10). Estos datos son similares a los reportados en otras series en las que la mediana de supervivencia cáncer específica de portadores de mutaciones *gBRCA2* fue de 8,6 años frente a 15,7 años en no portadores, ($p=0,007$, HR, 3,21)^[121]. Previamente a la publicación de estos datos, Gallagher et al.^[119] reportaron datos de una serie de 832 pacientes con cáncer de próstata localizado, todos de origen étnico Ashkenazi, incluyendo 20 y 6 pacientes con las mutaciones fundacionales *gBRCA2 6174delT* y *gBRCA1 185delAG*, respectivamente. Este estudio describió una mediana de supervivencia cáncer específica de 13,8 años para los portadores de mutaciones *gBRCA2*, significativamente más corta que la de los no portadores, ($p=0,001$; HR, 5,48). En nuestra serie la mediana de supervivencia cáncer específica de portadores de mutaciones *gBRCA2* con enfermedad localizada al diagnóstico fue de 11,3 años, sin alcanzarse la mediana de supervivencia cáncer específica en no portadores con enfermedad localizada al diagnóstico.

En el estudio islandés reportado por Tryggvadottir et al.^[226] se analizó si la mutación fundacional islandesa *gBRCA2 999del5* tenía algún efecto sobre el fenotipo y el pronóstico de la enfermedad. Analizaron un grupo de 89 pacientes que incluyó a 30 portadores de la mutación y 59 controles emparejados por edad y fecha desde el diagnóstico, reportando una

mediana de supervivencia cáncer específica de 2,1 años en portadores, mientras que en nuestro estudio la mediana de supervivencia cáncer específica fue de 9,1 años, atribuyéndose esa diferencia en parte a la mayor frecuencia de afectación ganglionar y / o estadio metastásico en pacientes con la mutación fundacional islandesa, ascendiendo ese porcentaje hasta el 55,2% de los pacientes analizados, mientras en nuestro estudio el 28,8% de los portadores tenían enfermedad metastásica y el 11% afectación ganglionar al diagnóstico, sin apreciarse a su vez grandes diferencias respecto a los datos reportados en el estudio PROREPAIR-B^[33]. Los datos de la mutación fundacional islandesa son similares a los reportados por Thorne et al.^[120] que analizaron un grupo de 40 pacientes con mutaciones *gBRCA2* y 97 no portadores, informando de una mediana de supervivencia global de 3,5 años para estos pacientes con tan solo 2 fallecimientos no asociados al cáncer de próstata y observándose una HR de 4,97 para supervivencia cáncer específica, frente a la de 2,10 en nuestra serie, aunque en este caso podría explicarse por el reducido número de variables probado en el modelo multivariable así como el bajo porcentaje de pacientes metastásicos al diagnóstico en el grupo control, 4%, frente a un 17,4% en el grupo de portadores de mutaciones *gBRCA2*.

Otros estudios publicados no analizan las muertes debidas específicamente al cáncer de próstata y carecen de grupo control para la comparación, como el publicado por Narod et al.^[118] de 67 pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* y 37 mutaciones *gBRCA1*, observándose que, a los 5 años del diagnóstico, el 58% de los pacientes con mutaciones *gBRCA2* y el 36% de los portadores de mutaciones *gBRCA1* habían fallecido sin especificarse la causa.

Entre las publicaciones más recientes, destaca el trabajo publicado por Castro et al.^[33] en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Este estudio demostró una supervivencia cáncer específica en portadores de mutaciones *gBRCA2* de 1,4 años frente a 2,8 años en no portadores, ($p=0,027$; HR 2,11), identificando las mutaciones *gBRCA2* como un factor pronóstico independiente para supervivencia cáncer específica también en cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. La magnitud de la diferencia mostrada en el valor del HR es similar a la obtenida en este trabajo (HR 2,10). Es importante destacar que ninguno de los portadores de esta serie había recibido un inhibidor de *PARP* y/o una quimioterapia basada en platino, que podrían haber tenido un efecto de

confusión en los datos de supervivencia, como ya se ha sugerido en series con mayor exposición a estos tratamientos^[227,228]. De hecho, en este tipo de comparaciones hemos de tener en cuenta además del posible impacto de los tratamientos administrados a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad; incluso la secuencia en la que estos tratamientos son administrados como se ha sugerido en el estudio PROREPAIR-B^[33]. Esta heterogeneidad supone una limitación a la hora de interpretar y comparar los resultados, aunque a la fecha, no se ha identificado ningún biomarcador que nos permita seleccionar la secuencia más apropiada de tratamientos en cáncer de próstata avanzado.

En este sentido, la heterogeneidad en los tratamientos y sus secuencias de administración pueden contribuir a explicar los resultados contradictorios presentados en los últimos años por tres series retrospectivas que han evaluado la respuesta de los portadores de mutaciones germinales en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA a la abiraterona, enzalutamida y/o docetaxel, tratamientos todos ellos que aumentan la supervivencia del cáncer de próstata en las fases avanzadas de la enfermedad^[228–230].

Por otra parte, el análisis de la cohorte exploratoria en nuestro estudio no muestra un papel pronóstico para las mutaciones *gBRCA1*. Datos previamente publicados han establecido que las mutaciones hereditarias en genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA más allá de *BRCA2* también predisponen al desarrollo de cáncer de próstata^[231–234], pero no en todos estos genes el mayor riesgo de desarrollo de cáncer de próstata va unido a una mayor agresividad o impacto pronóstico adverso, tanto en la enfermedad localizada como en la enfermedad avanzada^[33,119]. Por otra parte, el pequeño tamaño muestral de esta cohorte exploratoria en la que los pacientes con mutaciones *gBRCA1* no presentan diferencias en supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica, respecto a los no portadores, condiciona la interpretación definitiva de los resultados, dado que los valores atípicos pueden haber influido notablemente. A pesar de no observarse grandes diferencias en las características clínico-patológicas de los pacientes con mutaciones *gBRCA1* respecto a los no portadores (con la excepción de un mayor porcentaje de pacientes metastásicos al diagnóstico en los portadores de mutaciones *gBRCA1*, $p=0,003$), la similitud en el papel biológico y epidemiológico con las mutaciones *gBRCA2* observadas en otras enfermedades neoplásicas, conlleva que al igual que

ha ocurrido previamente con otras publicaciones no podemos aclarar definitivamente el valor pronóstico de las mutaciones *gBRCA1* en cáncer de próstata^[119,235].

6.2 RESULTADOS EN LA LÍNEA SOMÁTICA

6.2.1 *BRCA2* y *RB1*

Desde hace años conocemos que la delección del cromosoma 13q es un evento frecuente en el cáncer de próstata localizado, relacionado con la agresividad clínica^[236–238]. Trabajos más recientes, indican que esta delección puede estar presente en hasta el 21% de los pacientes con cáncer de próstata localizado, asociándose con un estadio tumoral más avanzado al diagnóstico y recaída bioquímica precoz^[225]. Por otra parte, Hieronymus et al. demostraron que la magnitud de alteraciones del número de copias del genoma es un factor pronóstico independiente en cáncer de próstata para la recaída después de la prostatectomía radical, así como para el desarrollo de metástasis^[239]. En este contexto, la caracterización molecular a nivel somático de las alteraciones en el número de copias de *BRCA2* en los pacientes incluidos en nuestro análisis, nos permitió identificar una pérdida *sBRCA2* en el 43,8% de los casos y en el 11,8% de los controles, siendo esta alteración significativamente más frecuente en pacientes con mutaciones *gBRCA2*, $p < 0,001$, aunque por debajo de la descrita en otras series más pequeñas de pacientes con mutaciones *gBRCA2*^[240,241].

La pérdida somática del segundo alelo apoya la hipótesis de que la pérdida de función completa de *BRCA2* por alteración de ambos alelos, puede ser uno de los mecanismos que desencadena el proceso de carcinogénesis en los pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*. No obstante, teniendo en cuenta que no todos los pacientes con mutaciones *gBRCA2* presentan pérdida de *BRCA2* a nivel somático, no podemos descartar que haya mecanismos complementarios como el silenciamiento epigenético del alelo no alterado, que no ha sido posible analizar en nuestras muestras.

En nuestros datos no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con pérdida monoalélica y la pérdida bialélica de *BRCA2* para las diferentes supervivencias analizadas. De hecho, tanto la pérdida bialélica de *BRCA2* como la pérdida monoalélica aportan un peor pronóstico a los pacientes en términos de supervivencia cáncer

específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica respecto a los individuos no portadores de dichas alteraciones, hallazgos coincidentes a los reportados recientemente por Jonsson et al.^[100]

Por otra parte, disponemos de estudios que han demostrado que la pérdida de *RB1* en cáncer de próstata está asociada con la progresión a fases de resistencia a la castración y el desarrollo de metástasis^[63,64,136,138,139,197]. Hallazgos en la misma línea que los descritos en nuestra serie, donde se evidenciaron diferencias significativas para supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica entre los pacientes con pérdida bialélica o monoalélica de *RB1* y los pacientes sin pérdida de *RB1*. En otro contexto, el reciente estudio de Abida et al.^[242] sugiere que las alteraciones de *RB1* se asocian a peor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración tratados con inhibidores selectivos del receptor androgénico.

Resultados previos de nuestro grupo ya sugerían una alta frecuencia de las deleciones en el gen *RB1* en los pacientes con mutaciones *gBRCA2*^[243], lo que constituía una de las hipótesis iniciales de este trabajo. Estos resultados han sido apoyados por trabajos posteriores como el de Annala et al.^[229] donde se asocian estas alteraciones *gBRCA2* con mayor frecuencia de deleciones heterocigotas de *RB1*. En nuestra serie observamos una pérdida somática de *RB1* en el 54,8% de los portadores de alteraciones *gBRCA2* y en el 21,3% de los no portadores de mutaciones *gBRCA2*, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$ y observándose una mayor frecuencia de mutaciones somáticas en *RB1* en el grupo de controles respecto a la descrita previamente en otros trabajos^[244], lo que puede ser fruto del emparejamiento llevado a cabo en nuestro estudio por factores de riesgo, incluidos el estadio tumoral al diagnóstico y el grado de Gleason.

En modelos preclínicos de cáncer de próstata humano, Chakraborty et al.^[245] han demostrado recientemente que la pérdida de una sola copia de *BRCA2* y su vecino cromosómico *RB1* en líneas celulares podría ser suficiente para aumentar la agresividad de estos modelos. De forma similar el análisis *in silico* de los datos de secuenciación masiva de diversas series^[64,246], sugieren que la co-pérdida de *BRCA2-RB1* puede estar asociada a un peor pronóstico en el cáncer

de próstata localizado. El análisis mediante FISH llevado a cabo en nuestra serie, nos permitió determinar con éxito el número de copias de *BRCA2* y *RB1*, mostrando datos coherentes con los hallazgos descritos previamente en las que se observa una co-delección casi uniforme de *BRCA2* con *RB1*, resultando en una alta co-linealidad de ambas variables por lo que se optó por explorar la existencia de la co-delección *BRCA2-RB1* como una única variable. Efectuando este análisis la supervivencia cáncer específica en pacientes con co-delección de *BRCA2-RB1* fue de 8 años y en pacientes sin co-delección de *BRCA2-RB1* de 16,9 años, identificándose un efecto pronóstico estadísticamente significativo e independiente ($p < 0,001$; HR, 3,24), tanto en pacientes con y sin mutaciones *gBRCA2*. Aunque no explorado en nuestra serie, Chakraborty et al.^[245] mostraron en modelos preclínicos que la co-pérdida de ambos genes, podría aumentar la sensibilidad a los inhibidores de *PARP* con respecto a la no pérdida o pérdida individual de cada uno de ellos. Esto no solo ofrece una potencial estrategia de tratamiento para esta variante agresiva del cáncer de próstata, sino que realza el posible valor de este hallazgo más allá de su valor pronóstico.

6.2.2 AMPLIFICACIÓN *MYC*

La amplificación de *MYC* se ha observado en un 8-10% de los tumores de próstata localizados^[64,128,247], siendo considerada un factor pronóstico desfavorable tras tratamiento inicial con intención radical^[128,248]. En nuestra serie observamos datos similares en la frecuencia de la amplificación de *MYC* en los pacientes no portadores de mutaciones (9,4%), mientras esta frecuencia en los pacientes con mutaciones *gBRCA2* aumentaba hasta un 47,9%. Dichos valores son ligeramente inferiores a los reportados por los trabajos de Castro et al. y Taylor et al. donde se analizaron series muy pequeñas con 12 y 8 tumores con mutaciones *gBRCA2* respectivamente^[127,243].

En ambos casos, tanto en portadores de mutaciones *gBRCA2* como en no portadores, el análisis univariable sugiere que la amplificación de *MYC* estaba asociada con peor pronóstico en términos de supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica, respecto a aquellos pacientes no portadores de dicha amplificación. En el análisis multivariable la amplificación de *MYC* permanece como factor pronóstico tanto en portadores como no portadores a efectos de

supervivencia cáncer específica y supervivencia libre de resistencia a la castración, sin embargo no permanece como factor pronóstico independiente en la supervivencia libre de progresión metastásica, esto podría ser debido a que la amplificación de *MYC* en nuestro estudio es muy superior en pacientes metastásicos que en los no metastásicos de inicio y que el efecto pronóstico en los pacientes metastásicos este influenciado por la disminución del tamaño muestral en este subgrupo, dado que la amplificación de *MYC* ya ha sido asociada a una menor supervivencia libre de progresión metastásica en otra series previamente^[127,174,249].

Este hecho, podría contribuir a explicar el mal pronóstico inherente de los pacientes con mutaciones *gBRCA2*, siendo relevante desde el punto de vista clínico, para la identificación de nuevas dianas terapéuticas, ya que se han desarrollado diversas estrategias de tratamiento dirigidas frente a *MYC*, entre las que destaca el uso de inhibidores frente a las proteínas de la familia de bromodominio *BET* interrumpiendo las interacciones *BRD4* / AR y la subsiguiente transcripción dirigida por el AR de *MYC*, demostrando eficacia en modelos preclínicos de cáncer de próstata resistente a la castración^[250,251].

6.2.3 *PTEN*

Existe cierta variabilidad en la tasa informada de deleciones reportadas del gen *PTEN* en cáncer de próstata, no disponemos de ensayos validados analíticamente para su determinación, lo cuál contribuye a esta diversidad. En las series quirúrgicas que utilizan FISH como método detección de la pérdida de *PTEN* se ha informado la pérdida de al menos un alelo de *PTEN* en hasta un 68% de los tumores primarios^[252-255]. No obstante, estudios posteriores han reportado la deleción homocigota de *PTEN* en alrededor del 15-20% de los tumores analizados^[256,257]. Estos últimos datos son más similares a los obtenidos en nuestra serie, en la que observamos la pérdida de *PTEN* en un 34,2% de los casos y en un 26,8% de los controles, no obstante, en fases más avanzadas de la enfermedad se han descrito hasta un 30% de deleciones profundas (probablemente homocigotas) en los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración analizados, con mutaciones truncadas y fusiones de genes en un 10% adicional^[65]. Las diferencias en la frecuencia de pérdida de *PTEN* entre las series de enfermedad localizada y enfermedad avanzada podrían sugerir que este evento en la

mayoría de los casos esta ya presenta en el tumor primario. De hecho, Ferraldeschi et al. demostraron que existe una concordancia del 90% en el estatus de *PTEN* entre la muestra del tumor primario y la enfermedad metastásica^[258]. Se han desarrollado diversos estudios que utilizan inmunohistoquímica y FISH para medir de forma reproducible la proteína *PTEN* y la pérdida génica usando biopsias de tejido tumoral de diagnóstico y células tumorales circulantes en plasma^[257,259-261], existiendo alta correlación entre su determinación en el tumor primario, en las lesiones metastásicas o plasma^[253,262], lo que contribuiría a validar la utilidad de la determinación de *PTEN* en las muestras diagnósticas de cáncer de próstata localizado para su posible aplicación en fases avanzadas

En estadios iniciales de cáncer de próstata se ha descrito la pérdida homocigota de *PTEN* como un factor de mal pronóstico asociado a la recaída bioquímica después de la prostatectomía^[256,263-266], así como un indicador independiente de muerte cáncer específica en pacientes tratados quirúrgicamente o en vigilancia activa^[257,267]. El metanálisis publicado por Wang et al. reafirmó la fuerte asociación entre la delección homocigota de *PTEN* con un mayor grado de Gleason y una mayor afectación extraprostática en pacientes con cáncer de próstata localizado tratados mediante prostatectomía radical^[268]. En base a estos datos puede considerarse *PTEN* como un factor pronóstico establecido. Nuestros resultados no confirman su valor pronóstico independiente cuando otras alteraciones genéticas son consideradas en el análisis multivariable, si bien es cierto que las asociaciones en el análisis univariable presentan tendencias similares a las descritas en la literatura, independientemente de ello Ferraldeschi et al. reportaron que la pérdida de *PTEN* era un factor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración y podría ser un factor predictivo asociado a una respuesta menos duradera a abiraterona^[258]. En 2020 se han presentado datos preliminares del ensayo fase III IPATential 150 que ratifican el posible valor predictivo de la pérdida de *PTEN* para el uso de la combinación de abiraterona con inhibidores de AKT^[190].

6.2.4 REORDENAMIENTO *TMPRSS2-ERG*

En relación al reordenamiento dirigido por andrógenos *TMPRSS2-ERG*, previamente nuestro grupo había realizado la caracterización de este reordenamiento en 29 tumores con

mutaciones germinales de *BRCA* de nuestra serie (25 *BRCA2* y 4 *BRCA1*), encontrando un reordenamiento con amplificación de *ERG* en 19 de los 29 casos analizados (65,5%)^[269]. La frecuencia de este reordenamiento en casos de cáncer de próstata emparejados por el grado de Gleason, estadio tumoral y rango de PSA fue de casi el 40% en estos datos iniciales, lo que está en línea con la frecuencia descrita en la literatura y con los datos finales reportados en este análisis, donde el 41,4% de los pacientes con mutaciones *gBRCA2* presentaron reordenamiento *TMPRSS2-ERG*, a pesar no disponer de tejido tumoral suficiente para realizar las determinaciones en toda la cohorte tanto de casos como de controles, ya que no se priorizó esta determinación y solo se realizó tras la realización de las anteriores determinaciones somáticas, lo que limita parcialmente la interpretación de los resultados obtenidos.

Respecto a la importancia pronóstica de la presencia del reordenamiento *TMPRSS2-ERG* en el tumor primario, podemos considerar que actualmente sigue siendo objeto de debate, con estudios en uno y otro sentido en la enfermedad localizada^[270]. En concreto, en nuestro análisis no se observaron diferencias en supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de resistencia a la castración y supervivencia libre de progresión metastásica entre aquellos pacientes con reordenamiento *TMPRSS2-ERG* y aquellos en los que no se evidenció, tanto en los casos como en los controles analizados. Sin embargo, la amplificación de *ERG* en el contexto del gen de fusión (reordenamiento tipo *Edel2+*) si se ha asociado con peor pronóstico, pudiendo ser uno de los primeros eventos oncogénicos en cáncer de próstata, Además, los datos presentados por Attard et al. sugieren que los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásicos *Edel2+* en el tumor primario, son los que más se beneficiarían del tratamiento con abiraterona pre-quimioterapia^[208]. Por el contrario, la sobreexpresión de *ERG* se ha asociado con la resistencia a taxanos en los resultados preliminares de Galletti et al. debido a que la sobreexpresión de *ERG* afectaría a la capacidad de los taxanos de unirse a los microtúbulos y por lo tanto dificultaría el mecanismo de acción antitumoral del docetaxel o del cabazitaxel en estos tumores^[271].

6.3 LIMITACIONES GENERALES DEL ESTUDIO

A diferencia de los estudios previamente publicados que analizan las mutaciones *gBRCA1/2* que generalmente han empleado un diseño de estudio de cohortes^[33,121,122], en este caso se empleó un diseño de casos y controles. Las variables de emparejamiento seleccionadas fueron todos los factores pronósticos establecidos al diagnóstico inicial, como el grado de Gleason ≥ 8 , la existencia de metástasis, valor del PSA y tratamiento local recibido. Estos factores no eran controlados en los estudios previos y podían actuar como potenciales factores de confusión, sobre todo para los objetivos secundarios de este proyecto, que conllevan el análisis de alteraciones somáticas. De hecho disponemos de datos que indican que aún con similares valores de PSA al diagnóstico, la afectación ganglionar o de metástasis a distancia así como un grado de Gleason ≥ 8 al diagnóstico, son factores más frecuentes en los portadores de mutaciones en *BRCA* que desarrollan cáncer de próstata que en los no portadores de dichas aberraciones^[121], demostrando que las mutaciones germinales en *BRCA2* son un factor pronóstico para el desarrollo de metástasis y la supervivencia cáncer específica, independientemente de otros factores pronósticos clásicos como el nivel de PSA al diagnóstico o el estadio tumoral TNM. Inicialmente se realizó un emparejamiento de casos y controles con una ratio 1:2. No obstante, tras la selección inicial, 7 pacientes con mutaciones *gBRCA2*, 33 no portadores y 1 paciente de la cohorte exploratoria con mutaciones *gBRCA1* fueron excluidos, principalmente por no ser posible el análisis del tejido tumoral (baja calidad del tejido y ausencia o escaso tejido tumoral disponible). En la mayoría de los casos y controles eliminados de este análisis las muestras tumorales disponibles correspondían a biopsias-cilindro de la próstata con escaso número de cilindros afectados, con un porcentaje de afectación tumoral bajo en los mismos o en el que el tejido tumoral ya había sido devastado. Este hecho remarca la importancia que en el futuro pueda tener tanto la obtención de mayor material diagnóstico, como su preservación para futuros análisis moleculares. La exclusión de estos casos y controles obligó a que el emparejamiento de algunos casos fuera 1:1 en vez de 1:2.

El análisis de las alteraciones somáticas tanto en portadores de mutaciones en *BRCA* como en los controles no mutados, es un aspecto fundamental de este estudio. Para ello utilizamos las biopsias diagnósticas o muestras tumorales del tratamiento inicial (resecciones transuretrales

prostáticas o prostatectomía radical). Si bien nuestro estudio se centra en el efecto de estas alteraciones desde el diagnóstico, podría estar limitado si estas alteraciones son adquiridas a posteriori durante la progresión de la enfermedad, ya que la frecuencia de estas alteraciones podría aumentar de forma notoria en la enfermedad resistente a castración^[33,116], con respecto a la enfermedad localizada^[63,64]. Alrededor del 20-25% de los tumores de pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico presentan alteraciones en genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA^[33,63-65,116,175,242], pudiendo representar las mutaciones germinales hasta la mitad de estos casos^[117]. En todos los estudios realizados tanto en enfermedad localizada como en enfermedad avanzada, *BRCA2* es el gen más frecuentemente alterado, tanto en línea germinal como somática^[33,63,65,116,175]. Ensayos clínicos recientes en cáncer de próstata resistente a la castración metastásico como el PROfound^[227], no sólo nos muestra las dificultades de analizar las alteraciones somáticas en el tejido tumoral diagnóstico, sino que cuando es posible analizarlo la frecuencia de alteraciones en genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA es similar en la muestra histórica del tumor primario (27% de alteraciones) que en una biopsia reciente de la enfermedad metastásica (32%). Estos datos son confirmados por Mateo et al.^[101] mostrando que estas alteraciones son un evento temprano en la evolución de determinados tumores de próstata, al analizar biopsias diagnosticas de tumores localizados, emparejadas con biopsias realizadas en la fase de resistencia a la castración y encontrar que en la mayoría de los casos los defectos en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA ya están en el tumor primario.

Otra limitación de nuestro estudio puede venir dada por la metodología de análisis citogenético, empleada para evaluar las alteraciones somáticas de *BRCA2*, *RB1*, *PTEN*, *MYC*, y *TMPRSS2-ERG*. Mediante la caracterización de alteraciones por FISH es posible detectar alteraciones numéricas como deleciones o ganancias de copias de regiones cromosómicas que engloben a los genes de interés o cambios estructurales como reordenamientos. Sin embargo, con respecto a las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación, nuestra metodología podría detectar menos alteraciones, ya que no puede detectar mutaciones puntuales o deleciones e inserciones de menor tamaño que si pueden ser identificadas mediante secuenciación. No obstante, un análisis simple de las series de datos de secuenciación somática de la herramienta cBioPortal (www.cbioportal.org) muestra que en el

cáncer de próstata la gran mayoría de las alteraciones somáticas en los genes de interés en nuestro estudio, corresponden con cambios a nivel cromosómico, por lo cuál sólo perderíamos una pequeña proporción de casos. De hecho, la determinación de las alteraciones bialélicas vs monoalélicas mediante secuenciación se basa en modelos matemáticos probabilísticos al no ser posible diferenciar si las alteraciones medidas ocurren en el alelo en cis- y/o en el alelo en trans-. La lectura de los resultados a nivel celular permite observar si las alteraciones ocurren en 1 o en ambos alelos. Su interpretación requiere la enumeración detallada de las señales fluorescentes en, al menos, 100 células de cada muestra tumoral, pero implica un posible sesgo del observador al interpretar visualmente los resultados. En nuestra serie esto último se controló mediante una doble lectura de las muestras, en las que los observadores eran ciegos a las lecturas de otros observadores.

Existen eventos genéticos concurrentes como la presencia de mutaciones en *SPOP*, *TP53* o variantes histológicas como las intraductales que no hemos analizado, muchos de estos eventos se han asociado con cáncer de próstata de mal pronóstico y en algunos casos podrían estar presentes con mayor frecuencia en tumores con alteraciones en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA^[127,272,273]. De la misma manera no hemos analizado la magnitud de las alteraciones en el número de copias o la inestabilidad genómica del tumor de una manera global, estas alteraciones podrían estar asociadas con deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA como ya ha mostrado nuestro grupo en los pacientes con alteraciones germinales de *BRCA2*^[243].

Tras la reciente recomendación publicada en las guías de la NCCN^[274] para la detección de mutaciones en la línea germinal y la implementación de paneles de secuenciación en la práctica clínica habitual con la finalidad de buscar anomalías genéticas, es probable que en un futuro próximo aumente la identificación de pacientes con defectos genéticos en los genes implicados en los mecanismos de reparación del DNA en la línea germinal. Las implicaciones clínicas tanto a nivel pronóstico como a nivel predictivo de respuesta a tratamiento con inhibidores de *PARP*^[58,227], de las alteraciones en estos genes identificadas a nivel germinal y los resultados de los análisis somáticos en estos tumores, argumentan fuertemente la necesidad de llevar a cabo análisis genéticos tanto de línea germinal como somática en todos

DISCUSIÓN

los pacientes con cáncer de próstata avanzado que requieran tratamiento sistémico, independientemente de la detección basada en los antecedentes familiares.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de cáncer de próstata en los países desarrollados^[275], la creciente necesidad de pruebas genéticas y la escasez de asesores genéticos, se hace cada más necesaria la implementación de consultas genéticas centradas en el cáncer de próstata, dónde los pacientes puedan ser asesorados por un urólogo u oncólogo capacitado, en este enfoque sumamente relevante de esta enfermedad^[275].

La caracterización clínica y molecular del cáncer de próstata llevada a cabo en pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* se puede considerar fundamental desde el punto de visto clínico. El mejor conocimiento de estos tumores con un pronóstico desfavorable podría modificar el manejo inicial, en la mayoría de pacientes con enfermedad avanzada, permitiendo identificar aquellos con características más adversas dentro de este subgrupo, abriéndose el horizonte para plantear nuevas estrategias terapéuticas.

7 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Este trabajo representa la serie más larga de tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* reunida para analizar el impacto clínico de las alteraciones somáticas en cáncer de próstata.

- Nuestro estudio confirma el valor pronóstico independiente de las mutaciones germinales en *BRCA2* para supervivencia cáncer específica en cáncer de próstata.
- Se confirma el valor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión metastásica y supervivencia libre de resistencia a la castración en pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2*.
- Las alteraciones somáticas en *BRCA2*, *RB1* y *MYC* fueron significativamente más frecuentes en pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* que en pacientes no portadores. La mayoría de los casos con pérdida de *BRCA2* presentaban también pérdida de *RB1* (co-delección *BRCA2-RB1*).
- La co-delección somática de *BRCA2-RB1* y la amplificación de *MYC* definen un subtipo agresivo de cáncer de próstata, con mal pronóstico tanto en pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* como en no portadores.
- Los datos analizados no demuestran el valor pronóstico de las mutaciones germinales en *BRCA1* para supervivencia cáncer específica en cáncer de próstata, supervivencia libre de progresión metastásica y supervivencia libre de resistencia a la castración.

8 BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del Cáncer en España 2020 [Internet]. 2020;Available from: <https://seom.org/dmccancer/cifras-del-cancer/>
2. REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer. [Internet]. Available from: <http://redecn.es/redecn.org/es/page3f38.html?id=21&title=estadisticas>.
3. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J cancer* 2015;137(7):1749–57.
4. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, Rodríguez-Antolín A, Villavicencio H, Cantalapiedra A, et al. [National prostate cancer registry 2010 in Spain]. *Actas Urol Esp* 2013;37(1):12–9.
5. Carlsson S, Vickers AJ, Roobol M, Eastham J, Scardino P, Lilja H, et al. Prostate cancer screening: Facts, statistics, and interpretation in response to the US Preventive Services Task Force review. *J Clin Oncol* 2012;30(21):2581–4.
6. Basch E, Oliver TK, Vickers A, Thompson I, Kantoff P, Parnes H, et al. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen testing: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;30(24):3020–5.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020;70(1):7–30.
8. Instituto Nacional de Estadística. Estadística de Defunciones [Internet]. 2020;Available from: <https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t15/p417/a2018/l0/&file=01001.px>.
9. Eble JN, Sauter JN, Epstein JI. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 2000.
10. Risbridger GP, Taylor RA, Clouston D, Sliwinski A, Thorne H, Hunter S, et al. Patient-derived xenografts reveal that intraductal carcinoma of the prostate is a prominent pathology in brca2 mutation carriers with prostate cancer and correlates with poor prognosis. *Eur Urol [Internet]* 2015;67(3):496–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2014.08.007>
11. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, et al. Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. *Eur J Cancer* 2019;121:7–18.
12. Amin, Mahul B., Edge, Stephen, Greene, Frederick, Byrd, David R., Brookland, Robert K., Washington, Mary K., Gershenwald JE. *AJCC Cancer Staging Form Supplement. Ajcc Cancer Staging Manual, Eighth Ed 2018;(June):303–10.*
13. Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29(9):1228–42.
14. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol* 2010;183(2):433–40.
15. Epstein JI, Amin MB, Beltran H, Lotan TL, Mosquera J-M, Reuter VE, et al. Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Am J Surg Pathol* 2014;38(6):756–67.
16. NCCN Prostate Guidelines. 2020;Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf
17. Walz J, Chun FK-H, Klein EA, Reuther A, Saad F, Graefen M, et al. Nomogram predicting the probability of

BIBLIOGRAFÍA

- early recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 2009;181(2):601–8.
18. Porter CR, Gallina A, Kodama K, Gibbons RP, Correa RJ, Perrotte P, et al. Prostate cancer-specific survival in men treated with hormonal therapy after failure of radical prostatectomy. *Eur Urol* 2007;52(2):446–52.
 19. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 2011;364(18):1708–17.
 20. 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* 2012;367(3):203–13.
 21. Zietman AL, Bae K, Slater JD, Shipley WU, Efstathiou JA, Coen JJ, et al. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010;28(7):1106–11.
 22. Zapatero A, Guerrero A, Maldonado X, Alvarez A, Gonzalez San Segundo C, Cabeza Rodríguez MA, et al. High-dose radiotherapy with short-term or long-term androgen deprivation in localised prostate cancer (DART01/05 GICOR): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(3):320–7.
 23. Derek Raghavan, Howard I Scheer SAL and PHL. Androgen withdrawal therapy: new perspectives in the treatment of prostate cancer. In: Principles and practices of genitourinary. In: Lippincott-Raven Publishers P, editor. Hormonal manipulation for metastatic prostate cancer. 1997. page 57 (1): 583-591.
 24. Shore ND, Saad F, Cookson MS, George DJ, Saltzstein DR, Tutrone R, et al. Oral Relugolix for Androgen-Deprivation Therapy in Advanced Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020;382(23):2187–96.
 25. Bolla M, Collette L, Blank L, Warde P, Dubois JB, Mirimanoff R-O, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet (London, England)* 2002;360(9327):103–6.
 26. Bolla M, Van Tienhoven G, Warde P, Dubois JB, Mirimanoff R-O, Storme G, et al. External irradiation with or without long-term androgen suppression for prostate cancer with high metastatic risk: 10-year results of an EORTC randomised study. *Lancet Oncol* 2010;11(11):1066–73.
 27. Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, Matthews J, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *Lancet Oncol* 2011;12(5):451–9.
 28. Horwitz EM, Bae K, Hanks GE, Porter A, Grignon DJ, Brereton HD, et al. Ten-year follow-up of radiation therapy oncology group protocol 92-02: a phase III trial of the duration of elective androgen deprivation in locally advanced prostate cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26(15):2497–504.
 29. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol* 2020;
 30. Dehm SM, Tindall DJ. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006;99(2):333–44.
 31. Nelson PS. Molecular states underlying androgen receptor activation: a framework for therapeutics targeting androgen signaling in prostate cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;30(6):644–6.

BIBLIOGRAFÍA

32. Bubley GJ, Balk SP. Treatment of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Oncologist* 1996;1(1 & 2):30–5.
33. Castro E, Romero-Laorden N, Del Pozo A, Lozano R, Medina A, Puente J, et al. Prorepair-B: A prospective cohort study of the impact of germline DNA repair mutations on the outcomes of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2019;37(6):490–503.
34. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14(2):149–58.
35. Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2015;373(8):737–46.
36. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2016;387(10024):1163–77.
37. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G, et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2020;31(9):1119–34.
38. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2017;377(4):352–60.
39. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med* 2017;377(4):338–51.
40. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2019;381(1):13–24.
41. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2019;381(2):121–31.
42. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide and Overall Survival in Prostate Cancer. *Eur Urol* 2021;79(1):150–8.
43. Sternberg CN, Fizazi K, Saad F, Shore ND, De Giorgi U, Penson DF, et al. Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020;382(23):2197–206.
44. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer and Survival with Darolutamide. *N Engl J Med* 2020;383(11):1040–9.
45. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1996;14(6):1756–64.
46. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351(15):1502–12.
47. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PNJ, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*

BIBLIOGRAFÍA

- 2004;351(15):1513–20.
48. Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: Final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012;13(10):983–92.
 49. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 stud. *Lancet Oncol* 2015;16(2):152–60.
 50. Fizazi K, Scher HI, Miller K, Basch E, Sternberg CN, Cella D, et al. Effect of enzalutamide on time to first skeletal-related event, pain, and quality of life in men with castration-resistant prostate cancer: results from the randomised, phase 3 AFFIRM trial. *Lancet Oncol* 2014;15(10):1147–56.
 51. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014;371(5):424–33.
 52. Loriot Y, Miller K, Sternberg CN, Fizazi K, De Bono JS, Chowdhury S, et al. Effect of enzalutamide on health-related quality of life, pain, and skeletal-related events in asymptomatic and minimally symptomatic, chemotherapy-naive patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (PREVAIL): results from a randomised, . *Lancet Oncol* 2015;16(5):509–21.
 53. Basch E, Loblaw DA, Oliver TK, Carducci M, Chen RC, Frame JN, et al. Systemic therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: American Society of Clinical Oncology and Cancer Care Ontario clinical practice guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014;32(30):3436–48.
 54. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet (London, England)* 2010;376(9747):1147–54.
 55. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O’Sullivan JM, Fosså SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2013;369(3):213–23.
 56. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wülfing C, et al. Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2019;381(26):2506–18.
 57. Oudard S, Fizazi K, Sengeløv L, Daugaard G, Saad F, Hansen S, et al. Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017;35(28):3189–97.
 58. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020;382(22):2091–102.
 59. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020;
 60. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2012;487(7406):239–43.
 61. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol* 2013;63(5):920–6.

BIBLIOGRAFÍA

62. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2016;22(4):369–78.
63. Armenia J, Wankowicz SAM, Liu D, Gao J, Kundra R, Reznik E, et al. The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* 2018;50(5):645–51.
64. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015;163(4):1011–25.
65. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015;161(5):1215–28.
66. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, Arora V, Rickman D, Ayala G, et al. Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20(11):2846–50.
67. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(1):22–33.
68. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366–74.
69. Bastus NC, Boyd LK, Mao X, Stankiewicz E, Kudahetti SC, Oliver RTD, et al. Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2010;70(23):9544–8.
70. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001;291(5507):1284–9.
71. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 2008;9(8):619–31.
72. Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 2003;544(2–3):107–14.
73. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(1):89–96.
74. Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(3):196–207.
75. Shen Z, Nickoloff JA. Mammalian Homologous Recombination Repair and Cancer Intervention [Internet]. In: *DNA Repair, Genetic Instability, and Cancer*. WORLD SCIENTIFIC; 2007. page 119–56. Available from: https://doi.org/10.1142/9789812706782_0005
76. Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2006;5(9–10):1021–9.
77. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 2008;77:229–57.
78. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(12):957–67.
79. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008;36(17):5678–94.
80. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):155–68.
81. Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003;24(10):1571–80.

BIBLIOGRAFÍA

82. Oliver AW, Paul A, Boxall KJ, Barrie SE, Aherne GW, Garrett MD, et al. Trans-activation of the DNA-damage signalling protein kinase Chk2 by T-loop exchange. *EMBO J* 2006;25(13):3179–90.
83. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res* 2009;7(7):1110–8.
84. Lee J-H, Mand MR, Kao C-H, Zhou Y, Ryu SW, Richards AL, et al. ATM directs DNA damage responses and proteostasis via genetically separable pathways. *Sci Signal* 2018;11(512).
85. Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, et al. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 2005;434(7033):598–604.
86. Mimitou EP, Symington LS. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 2009;8(9):983–95.
87. Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G, et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J* 2001;20(17):4704–16.
88. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(15):1310–6.
89. Bunting SF, Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(7):443–54.
90. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003;23(16):5706–15.
91. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 2008;18(1):134–47.
92. Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, et al. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2007;177(2):219–29.
93. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2013;2(3):130–43.
94. Lehman JA, Hoelz DJ, Turchi JJ. DNA-dependent conformational changes in the Ku heterodimer. *Biochemistry* 2008;47(15):4359–68.
95. Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* 2007;26(4):1010–23.
96. Goodwin JF, Schiewer MJ, Dean JL, Schrecengost RS, de Leeuw R, Han S, et al. A hormone-DNA repair circuit governs the response to genotoxic insult. *Cancer Discov* 2013;3(11):1254–71.
97. Goodwin JF, Kothari V, Drake JM, Zhao S, Dylgjeri E, Dean JL, et al. DNA-PKcs-Mediated Transcriptional Regulation Drives Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Cell* 2015;28(1):97–113.
98. Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA, et al. Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol [Internet]* 2019;5(4):471–8. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC6459218>
99. Lozano R, Castro E, Aragón IM, Cendón Y, Cattrini C, López-Casas PP, et al. Genetic aberrations in DNA repair pathways: a cornerstone of precision oncology in prostate cancer. *Br J Cancer* 2020;
100. Jonsson P, Bandlamudi C, Cheng ML, Srinivasan P, Chavan SS, Friedman ND, et al. Tumour lineage shapes BRCA-mediated phenotypes. *Nature* 2019;571(7766):576–9.

BIBLIOGRAFÍA

101. Mateo J, Seed G, Bertan C, Rescigno P, Dolling D, Figueiredo I, et al. Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *J Clin Invest* 2020;130(4):1743–51.
102. Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet* 1997;6(1):53–8.
103. Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5287–92.
104. Katsuki Y, Takata M. Defects in homologous recombination repair behind the human diseases: FA and HBOC. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(10):T19-37.
105. Buisson R, Dion-Côté A-M, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(10):1247–54.
106. Connor F, Bertwistle D, Mee PJ, Ross GM, Swift S, Grigorieva E, et al. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet* 1997;17(4):423–30.
107. Bork P, Blomberg N, Nilges M. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat. Genet.*1996;13(1):22–3.
108. Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, et al. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 2001;7(2):273–82.
109. Narod SA, Rodríguez AA. [Genetic predisposition for breast cancer: BRCA1 and BRCA2 genes]. *Salud Publica Mex* 2011;53(5):420–9.
110. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries. *JAMA - J Am Med Assoc* 2016;315(1):68–76.
111. Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000;343(2):78–85.
112. Thiessen EU. Concerning a familial association between breast cancer and both prostatic and uterine malignancies. *Cancer* 1974;34(4):1102–7.
113. Castro E, Eeles R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian J Androl [Internet]* 2012;14(3):409–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.150>
114. Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, Evans DG, Bancroft E, Adlard J, et al. Prostate Cancer Risk by BRCA2 Genomic Regions. *Eur Urol* 2020;78(4):494–7.
115. Darst BF, Dadaev T, Saunders E, Sheng X, Wan P, Pooler L, et al. Germline sequencing DNA repair genes in 5,545 men with aggressive and non-aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2020;
116. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2016;375(5):443–53.
117. Nicolosi P, Ledet E, Yang S, Michalski S, Freschi B, O’Leary E, et al. Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncol* 2019;5(4):523–8.
118. Narod SA, Neuhausen S, Vichodez G, Armel S, Lynch HT, Ghadirian P, et al. Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. *Br J Cancer* 2008;99(2):371–4.

BIBLIOGRAFÍA

119. Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchoff T, Balistreri L, Vora K, et al. Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(7):2115–21.
120. Thorne H, Willems AJ, Niedermayr E, Hoh IMY, Li J, Clouston D, et al. Decreased prostate cancer-specific survival of men with BRCA2 mutations from multiple breast cancer families. *Cancer Prev Res* 2011;4(7):1002–10.
121. Castro E, Goh C, Olmos D, Saunders E, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(14):1748–57.
122. Castro E, Goh C, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Dadaev T, et al. Effect of BRCA Mutations on Metastatic Relapse and Cause-specific Survival after Radical Treatment for Localised Prostate Cancer. *Eur Urol* [Internet] 2015;68(2):186–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.022>
123. Carter HB, Helfand B, Mamawala M, Wu Y, Landis P, Yu H, et al. Germline Mutations in ATM and BRCA1/2 Are Associated with Grade Reclassification in Men on Active Surveillance for Prostate Cancer. *Eur Urol* 2019;75(5):743–9.
124. Page EC, Bancroft EK, Brook MN, Assel M, Hassan Al Battat M, Thomas S, et al. Interim Results from the IMPACT Study: Evidence for Prostate-specific Antigen Screening in BRCA2 Mutation Carriers. *Eur Urol* 2019;76(6):831–42.
125. Giri VN, Knudsen KE, Kelly WK, Cheng HH, Cooney KA, Cookson MS, et al. Implementation of Germline Testing for Prostate Cancer: Philadelphia Prostate Cancer Consensus Conference 2019. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2020;38(24):2798–811.
126. Lozano R, Salles DC, Sandhu S, Aragón IM, Thorne H, López-Campos F, et al. Association between BRCA2 alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2021;147:74–83.
127. Taylor RA, Fraser M, Livingstone J, Espiritu SMG, Thorne H, Huang V, et al. Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nat Commun* [Internet] 2017;8:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13671>
128. Fraser M, Sabelnykova VY, Yamaguchi TN, Heisler LE, Livingstone J, Huang V, et al. Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. *Nature* 2017;541(7637):359–64.
129. Hassler M, Singh S, Yue WW, Luczynski M, Lakbir R, Sanchez-Sanchez F, et al. Crystal structure of the retinoblastoma protein N domain provides insight into tumor suppression, ligand interaction, and holoprotein architecture. *Mol Cell* 2007;28(3):371–85.
130. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(5):297–306.
131. Takahashi R, Hashimoto T, Xu HJ, Hu SX, Matsui T, Miki T, et al. The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(12):5257–61.
132. Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget* 2015;6(20):17873–90.
133. Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, Greenberg NM. Conditional deletion of Rb causes early stage

BIBLIOGRAFÍA

- prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64(17):6018–25.
134. Davis JN, McCabe MT, Hayward SW, Park JM, Day ML. Disruption of Rb/E2F pathway results in increased cyclooxygenase-2 expression and activity in prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2005;65(9):3633–42.
135. Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, Wang W, Goodrich DW, Roy-Burman P, et al. Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(16):7889–98.
136. Thangavel C, Boopathi E, Liu Y, Haber A, Ertel A, Bhardwaj A, et al. RB Loss Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res* 2017;77(4):982–95.
137. Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, et al. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(22):8751–5.
138. Sharma A, Yeow W-S, Ertel A, Coleman I, Clegg N, Thangavel C, et al. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest* 2010;120(12):4478–92.
139. Hamid AA, Gray KP, Shaw G, MacConaill LE, Evan C, Bernard B, et al. Compound Genomic Alterations of TP53, PTEN, and RB1 Tumor Suppressors in Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol [Internet]* 2019;76(1):89–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.11.045>
140. Foster CS, Falconer A, Dodson AR, Norman AR, Dennis N, Fletcher A, et al. Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene* 2004;23(35):5871–9.
141. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* 2016;22(3):298–305.
142. Aparicio AM, Shen L, Tapia ELN, Lu JF, Chen HC, Zhang J, et al. Combined tumor suppressor defects characterize clinically defined aggressive variant prostate cancers. *Clin Cancer Res* 2016;22(6):1520–30.
143. Tan H-L, Sood A, Rahimi HA, Wang W, Gupta N, Hicks J, et al. Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20(4):890–903.
144. Dyson NJ. RB1: A prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev* 2016;30(13):1492–502.
145. Yeh S, Miyamoto H, Nishimura K, Kang H, Ludlow J, Hsiao P, et al. Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248(2):361–7.
146. Hofman K, Swinnen J V, Verhoeven G, Heyns W. E2F activity is biphasically regulated by androgens in LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283(1):97–101.
147. Yuan R-H, Jeng Y-M, Chen H-L, Lai P-L, Pan H-W, Hsieh F-J, et al. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumour progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 2006;209(4):549–58.
148. Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK. Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273(32):20213–22.
149. Libertini SJ, Tepper CG, Guadalupe M, Lu Y, Asmuth DM, Mudryj M. E2F1 expression in LNCaP prostate cancer cells deregulates androgen dependent growth, suppresses differentiation, and enhances apoptosis. *Prostate* 2006;66(1):70–81.

BIBLIOGRAFÍA

150. Davis JN, Wojno KJ, Daignault S, Hofer MD, Kuefer R, Rubin MA, et al. Elevated E2F1 inhibits transcription of the androgen receptor in metastatic hormone-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(24):11897–906.
151. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell* [Internet] 2010;18(1):11–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>
152. Aparicio A, Den RB, Knudsen KE. Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2011;8(10):562–8.
153. Tyagi AK, Singh RP, Agarwal C, Chan DCF, Agarwal R. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2002;8(11):3512–9.
154. Gong X, Du J, Parsons SH, Merzoug FF, Webster Y, Iversen PW, et al. Aurora A Kinase Inhibition Is Synthetic Lethal with Loss of the RB1 Tumor Suppressor Gene. *Cancer Discov* 2019;9(2):248–63.
155. Oser MG, Fonseca R, Chakraborty AA, Brough R, Spektor A, Jennings RB, et al. Cells Lacking the RB1 Tumor Suppressor Gene Are Hyperdependent on Aurora B Kinase for Survival. *Cancer Discov* 2019;9(2):230–47.
156. Rodrigues DN, Casiraghi N, Romanel A, Crespo M, Miranda S, Rescigno P, et al. Rb1 heterogeneity in advanced metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25(2):687–97.
157. Ribeiro FR, Henrique R, Hektoen M, Berg M, Jerónimo C, Teixeira MR, et al. Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. *Mol Cancer* 2006;5:33.
158. Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, Meng A, Albert M, Syed A, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *Prostate* 2009;69(10):1091–100.
159. Kobayashi M, Ishida H, Shindo T, Niwa S-I, Kino M, Kawamura K, et al. Molecular analysis of multifocal prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 2008;68(16):1715–24.
160. Barfeld SJ, Fazli L, Persson M, Marjavaara L, Urbanucci A, Kaukoniemi KM, et al. Myc-dependent purine biosynthesis affects nucleolar stress and therapy response in prostate cancer. *Oncotarget* 2015;6(14):12587–602.
161. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 2005;7(3):311–8.
162. Mosquera JM, Beltran H, Park K, MacDonald TY, Robinson BD, Tagawa ST, et al. Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *Neoplasia* 2013;15(1):1–10.
163. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov* 2011;1(6):487–95.
164. Lee JK, Phillips JW, Smith BA, Park JW, Stoyanova T, McCaffrey EF, et al. N-Myc Drives Neuroendocrine Prostate Cancer Initiated from Human Prostate Epithelial Cells. *Cancer Cell* 2016;29(4):536–47.
165. Dardenne E, Beltran H, Benelli M, Gayvert K, Berger A, Puca L, et al. N-Myc Induces an EZH2-Mediated

BIBLIOGRAFÍA

- Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer Cell* 2016;30(4):563–77.
166. Zhang W, Liu B, Wu W, Li L, Broom BM, Basourakos SP, et al. Targeting the MYCN-PARP-DNA Damage Response Pathway in Neuroendocrine Prostate Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2018;24(3):696–707.
167. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet* 2015;47(7):736–45.
168. Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, Bartlett JMS. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2003;9(14):5271–81.
169. Prensner JR, Chen W, Han S, Iyer MK, Cao Q, Kothari V, et al. The long non-coding RNA PCAT-1 promotes prostate cancer cell proliferation through cMyc. *Neoplasia* 2014;16(11):900–8.
170. Vander Griend DJ, Litvinov I V, Isaacs JT. Conversion of androgen receptor signaling from a growth suppressor in normal prostate epithelial cells to an oncogene in prostate cancer cells involves a gain of function in c-Myc regulation. *Int J Biol Sci* 2014;10(6):627–42.
171. Antony L, van der Schoor F, Dalrymple SL, Isaacs JT. Androgen receptor (AR) suppresses normal human prostate epithelial cell proliferation via AR/β-catenin/TCF-4 complex inhibition of c-MYC transcription. *Prostate* 2014;74(11):1118–31.
172. Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* 2003;112(11):1724–31.
173. Geng C, Kaochar S, Li M, Rajapakshe K, Fiskus W, Dong J, et al. SPOP regulates prostate epithelial cell proliferation and promotes ubiquitination and turnover of c-MYC oncoprotein. *Oncogene* 2017;36(33):4767–77.
174. Stopsack KH, Nandakumar S, Wibmer AG, Haywood S, Weg ES, Barnett ES, et al. Oncogenic Genomic Alterations, Clinical Phenotypes, and Outcomes in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2020;26(13):3230–8.
175. Abida W, Armenia J, Gopalan A, Brennan R, Walsh M, Barron D, et al. Prospective Genomic Profiling of Prostate Cancer Across Disease States Reveals Germline and Somatic Alterations That May Affect Clinical Decision Making. *JCO Precis Oncol* 2017;(1):1–16.
176. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2012;487(7406):239–43.
177. Jamsapishvili T, Berman DM, Ross AE, Scher HI, De Marzo AM, Squire JA, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol [Internet]* 2018;15(4):222–34. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.9>
178. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998;273(22):13375–8.
179. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:127–50.
180. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]* 2012;13(5):283–96. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm3330>
181. Li S, Zhu M, Pan R, Fang T, Cao Y-Y, Chen S, et al. The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity. *Nat Immunol* 2016;17(3):241–9.

BIBLIOGRAFÍA

182. Chen L, Guo D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 2017;14(7):581–9.
183. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007;128(1):157–70.
184. Bassi C, Ho J, Srikumar T, Dowling RJO, Gorrini C, Miller SJ, et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* 2013;341(6144):395–9.
185. González-Billalabeitia E, Seitzer N, Song SJ, Song MS, Patnaik A, Liu X-S, et al. Vulnerabilities of PTEN-TP53-deficient prostate cancers to compound PARP-PI3K inhibition. *Cancer Discov* 2014;4(8):896–904.
186. van de Ven AL, Tangutoori S, Baldwin P, Qiao J, Gharagouzloo C, Seitzer N, et al. Nanoformulation of Olaparib Amplifies PARP Inhibition and Sensitizes PTEN/TP53-Deficient Prostate Cancer to Radiation. *Mol Cancer Ther* 2017;16(7):1279–89.
187. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandralapaty S, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell* [Internet] 2011;19(5):575–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.008>
188. Toren P, Kim S, Cordonnier T, Crafter C, Davies BR, Fazli L, et al. Combination AZD5363 with Enzalutamide Significantly Delays Enzalutamide-resistant Prostate Cancer in Preclinical Models. *Eur Urol* 2015;67(6):986–90.
189. Marques RB, Aghai A, de Ridder CMA, Stuurman D, Hoeben S, Boer A, et al. High Efficacy of Combination Therapy Using PI3K/AKT Inhibitors with Androgen Deprivation in Prostate Cancer Preclinical Models. *Eur Urol* 2015;67(6):1177–85.
190. de Bono JS, Bracarda S, Sternberg CN, Chi KN, Olmos D, Sandhu S, et al. LBA4 IPATential150: Phase III study of ipatasertib (ipat) plus abiraterone (abi) vs placebo (pbo) plus abi in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *Ann Oncol* 2020;31:S1153–4.
191. Espiritu SMG, Liu LY, Rubanova Y, Bhandari V, Holgersen EM, Szyca LM, et al. The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression. *Cell* [Internet] 2018;173(4):1003-1013.e15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.029>
192. Wedge DC, Gundem G, Mitchell T, Woodcock DJ, Martincorena I, Ghori M, et al. Sequencing of prostate cancers identifies new cancer genes, routes of progression and drug targets. *Nat Genet* 2018;50(5):682–92.
193. Hubbard GK, Mutton LN, Khalili M, McMullin RP, Hicks JL, Bianchi-Frias D, et al. Combined MYC Activation and Pten Loss Are Sufficient to Create Genomic Instability and Lethal Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res* 2016;76(2):283–92.
194. Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu M-M. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003;23(17):6139–49.
195. Bai F, Pei X-H, Pandolfi PP, Xiong Y. p18 Ink4c and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol* 2006;26(12):4564–76.
196. Gil J, Kerai P, Leonart M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, et al. immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res* 2005;65(6):2179–85.
197. Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW, et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress

BIBLIOGRAFÍA

- prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* (80-) 2017;355(6320).
198. Mu P, Zhang Z, Benelli M, Karthaus WR, Hoover E, Chen CC, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53-and RB1-deficient prostate cancer. *Science* (80-) 2017;355(6320).
199. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* (80-) 2005;310(5748):644–8.
200. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007;448(7153):595–9.
201. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(7):3396–400.
202. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furasato B, Sun C, Chen Y, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 2005;24(23):3847–52.
203. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(27):3659–68.
204. Polson ES, Lewis JL, Celik H, Mann VM, Stower MJ, Simms MS, et al. Monoallelic expression of TMPRSS2/ERG in prostate cancer stem cells. *Nat Commun* 2013;4:1623.
205. Mani R-S, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 2009;326(5957):1230.
206. Tomlins SA, Aubin SMJ, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med* 2011;3(94).
207. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AHM, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69(7):2912–8.
208. Attard G, De Bono JS, Logothetis CJ, Fizazi K, Mukherjee SD, Joshua AM, et al. Improvements in radiographic progression-free survival stratified by ERG gene status in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. *Clin Cancer Res* 2015;21(7):1621–7.
209. Danila DC, Anand A, Sung CC, Heller G, Leversha MA, Cao L, et al. TMPRSS2-ERG Status in circulating tumor cells as a predictive biomarker of sensitivity in castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. *Eur Urol* 2011;60(5):897–904.
210. Grande E, Fernandez Perez MP, Wetterskog D, Font Pous A, Vazquez-Estevéz S, Gonzalez del Alba A, et al. A phase II multicenter biomarker trial to study the predictive value of TMPRSS2-ERG before enzalutamide treatment in chemo-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* [Internet] 2019;37(15_suppl):5040. Available from: https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.5040
211. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 2009;41(5):619–24.
212. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 2009;41(5):524–6.

BIBLIOGRAFÍA

213. Reid AHM, Attard G, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Brewer D, et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;102(4):678–84.
214. D’Amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998;280(11):969–74.
215. Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, et al. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26(7):1148–59.
216. Lambros MBK, Simpson PT, Jones C, Natrajan R, Westbury C, Steele D, et al. Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: A reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. *Lab Invest* 2006;86(4):398–408.
217. Summersgill B, Clark J, Shipley J. Fluorescence and chromogenic in situ hybridization to detect genetic aberrations in formalin-fixed paraffin embedded material, including tissue microarrays. *Nat Protoc* 2008;3(2):220–34.
218. Attard G, Clark J, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27(3):253–63.
219. Clark J, Attard G, Jhavar S, Flohr P, Reid A, De-Bono J, et al. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 2008;27(14):1993–2003.
220. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(17):8347–51.
221. Perner S, Demichelis F, Beroukhi R, Schmidt FH, Mosquera J-M, Setlur S, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(17):8337–41.
222. Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 2006;66(21):10242–6.
223. Mottet N, Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, De Santis M, Fanti S, et al. EAU - EANM - ESTRO - ESUR - SIOG Guidelines on Prostate Cancer 2019. In: *European Association of Urology Guidelines 2019*. EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.; 2019. page 1–161.
224. Melamed J, Einhorn JM, Ittmann MM. Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 1997;3(10):1867–72.
225. Kluth M, Scherzai S, Büschek F, Fraune C, Möller K, Höflmayer D, et al. 13q deletion is linked to an adverse phenotype and poor prognosis in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2018;57(10):504–12.
226. Tryggvadóttir L, Vidarsdóttir L, Thorgeirsson T, Jonasson JG, Ólafsdóttir EJ, Ólafsdóttir GH, et al. Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(12):929–35.
227. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2020;383(24):2345–57.

BIBLIOGRAFÍA

228. Mateo J, Cheng HH, Beltran H, Dolling D, Xu W, Pritchard CC, et al. Clinical Outcome of Prostate Cancer Patients with Germline DNA Repair Mutations: Retrospective Analysis from an International Study. *Eur Urol* [Internet] 2018;73(5):687–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.01.010>
229. Annala M, Struss WJ, Warner EW, Beja K, Vandekerckhove G, Wong A, et al. Treatment Outcomes and Tumor Loss of Heterozygosity in Germline DNA Repair-deficient Prostate Cancer. *Eur Urol* 2017;72(1):34–42.
230. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Liang C, Wang H, Chen Y, et al. Germline DNA-repair Gene Mutations and Outcomes in Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Receiving First-line Abiraterone and Enzalutamide. *Eur Urol* [Internet] 2018;74(2):218–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.01.035>
231. Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26(18):3057–62.
232. Erkko H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 2007;446(7133):316–9.
233. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2012;106(10):1697–701.
234. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Olama AA Al, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* [Internet] 2014;11(1):18–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2013.266>
235. Mitra A, Fisher C, Foster CS, Jameson C, Barbachanno Y, Bartlett J, et al. Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. *Br J Cancer* 2008;98(2):502–7.
236. Afonso A, Emmert-Buck MR, Duray PH, Bostwick DG, Linehan WM, Vocke CD. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is associated with advanced stage prostate cancer. *J Urol* 1999;162(3 Pt 1):922–6.
237. Dong JT, Boyd JC, Frierson HFJ. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* 2001;49(3):166–71.
238. Hyytinen ER, Frierson HFJ, Boyd JC, Chung LW, Dong JT. Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(2):108–14.
239. Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(30):11139–44.
240. Willems AJ, Dawson S-J, Samarasinghe H, De Luca A, Antill YC, Hopper JL, et al. Loss of heterozygosity at the BRCA2 locus detected by multiplex ligation-dependent probe amplification is common in prostate cancers from men with a germline BRCA2 mutation. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14(10):2953–61.
241. Edwards SM, Evans DGR, Hope Q, Norman AR, Barbachano Y, Bullock S, et al. Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis. *Br J Cancer* 2010;103(6):918–24.
242. Abida W, Cyrta J, Heller G, Prandi D, Armenia J, Coleman I, et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;166(23):11428–36.
243. Castro E, Jugurnauth-Little S, Karlsson Q, Al-Shahrour F, Piñeiro-Yañez E, Van de Poll F, et al. High burden

BIBLIOGRAFÍA

- of copy number alterations and c-MYC amplification in prostate cancer from BRCA2 germline mutation carriers. *Ann Oncol* 2015;26(11):2293–300.
244. Robinson DR, Wu YM, Lonigro RJ, Vats P, Cobain E, Everett J, et al. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature* 2017;548(7667):297–303.
245. Chakraborty G, Armenia J, Mazu YZ, Nandakumar S, Stopsack KH, Atiq MO, et al. Significance of BRCA2 and RB1 Co-loss in Aggressive Prostate Cancer Progression. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2020;26(8):2047–64.
246. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23(6):703–13.
247. Espiritu SMG, Liu LY, Rubanova Y, Bhandari V, Holgersen EM, Szyca LM, et al. The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression. *Cell* 2018;173(4):1003-1013.e15.
248. Zafarana G, Ishkanian AS, Malloff CA, Locke JA, Sykes J, Thoms J, et al. Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer* 2012;118(16):4053–62.
249. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Jenkins RB, Lan F, Van Dang C, et al. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol* 2008;21(9):1156–67.
250. Asangani IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2014;510(7504):278–82.
251. Wyce A, Degenhardt Y, Bai Y, Le B, Korenchuk S, Crouthame M-C, et al. Inhibition of BET bromodomain proteins as a therapeutic approach in prostate cancer. *Oncotarget* 2013;4(12):2419–29.
252. Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Torres CH, Soares FA, et al. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* 2007;97(5):678–85.
253. Attard G, Reid AHM, Olmos D, de Bono JS. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res* 2009;69(12):4937–40.
254. 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* 2009;218(4):505–13.
255. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* 2009;22(8):1083–93.
256. Lotan TL, Wei W, Ludkovski O, Morais CL, Guedes LB, Jamaspishvili T, et al. Analytic validation of a clinical-grade PTEN immunohistochemistry assay in prostate cancer by comparison with PTEN FISH. *Mod Pathol* 2016;29(8):904–14.
257. Ahearn TU, Pettersson A, Ebot EM, Gerke T, Graff RE, Morais CL, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(2):1–9.
258. Ferraldeschi R, Nava Rodrigues D, Riisnaes R, Miranda S, Figueiredo I, Rescigno P, et al. PTEN protein loss and clinical outcome from castration-resistant prostate cancer treated with abiraterone acetate. *Eur Urol*

BIBLIOGRAFÍA

- [Internet] 2015;67(4):795–802. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.027>
259. Lotan TL, Heumann A, Rico SD, Hicks J, Lecksell K, Koop C, et al. PTEN loss detection in prostate cancer: comparison of PTEN immunohistochemistry and PTEN FISH in a large retrospective prostatectomy cohort. *Oncotarget* 2017;8(39):65566–76.
260. Yoshimoto M, Ludkovski O, DeGrace D, Williams JL, Evans A, Sircar K, et al. PTEN genomic deletions that characterize aggressive prostate cancer originate close to segmental duplications. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(2):149–60.
261. Leinonen KA, Saramäki OR, Furusato B, Kimura T, Takahashi H, Egawa S, et al. Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol* 2013;22(12):2333–44.
262. Carreira S, Romanel A, Goodall J, Grist E, Ferraldeschi R, Miranda S, et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci Transl Med* 2014;6(254).
263. Boström PJ, Bjartell AS, Catto JWF, Eggener SE, Lilja H, Loeb S, et al. Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. *Eur Urol* 2015;68(6):1033–44.
264. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer P-S, De Silva C, Meyer-Kornblum M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181(2):401–12.
265. Tosoian JJ, Almutairi F, Morais CL, Glavaris S, Hicks J, Sundi D, et al. Prevalence and Prognostic Significance of PTEN Loss in African-American and European-American Men Undergoing Radical Prostatectomy. *Eur Urol [Internet]* 2017;71(5):697–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.026>
266. Troyer DA, Jamaspishvili T, Wei W, Feng Z, Good J, Hawley S, et al. A multicenter study shows PTEN deletion is strongly associated with seminal vesicle involvement and extracapsular extension in localized prostate cancer. *Prostate* 2015;75(11):1206–15.
267. Reid AHM, Attard G, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Brewer D, et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;102(4):678–84.
268. Wang Y, Dai B. PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):5430–7.
269. Castro E, Van de Poll F, Piñeiro E, Nombela P, Bancroft E, Govindasami K, et al. Abstract 4249: High-Frequency of TMPRSS2-ERG fusion gene identifies a non-random androgen-driven event of chromosomal instability in BRCA mutated prostate cancer. *Cancer Res [Internet]* 2015;75(15 Supplement):4249 LP – 4249. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/4249.abstract
270. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luecke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 2011;17(18):5878–88.
271. Galletti G, Matov A, Beltran H, Fontugne J, Miguel Mosquera J, Cheung C, et al. ERG induces taxane resistance in castration-resistant prostate cancer. *Nat Commun* 2014;5:5548.
272. Risbridger GP, Taylor RA, Clouston D, Sliwinski A, Thorne H, Hunter S, et al. Patient-derived xenografts reveal that intraductal carcinoma of the prostate is a prominent pathology in BRCA2 mutation carriers

BIBLIOGRAFÍA

- with prostate cancer and correlates with poor prognosis. *Eur Urol* 2015;67(3):496–503.
273. Isaacsson Velho P, Silberstein JL, Markowski MC, Luo J, Lotan TL, Isaacs WB, et al. Intraductal/ductal histology and lymphovascular invasion are associated with germline DNA-repair gene mutations in prostate cancer. *Prostate* 2018;78(5):401–7.
274. Daly MB, Pilarski R, Yurgelun MB, Berry MP, Buys SS, Dickson P, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2020;18(4):380–91.
275. Cheng H, Powers J, Schaffer K, Sartor O. Practical Methods for Integrating Genetic Testing Into Clinical Practice for Advanced Prostate Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 2018;(38):372–81.

