

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL
CÁNCER DE PRÓSTATA CON ALTERACIONES EN
GENES RELACIONADOS CON LA REPARACIÓN DEL
ADN**

Rebeca Lozano Mejorada

2023

Directores: Prof Dr Juan Jesús Cruz Hernández, Dr David Olmos Hidalgo,
Dra Elena Castro Marcos

VNIVERSIDAD D SALAMANCA

Facultad de Medicina Departamento de Medicina

Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca;

Dr. David Olmos Hidalgo, Licenciado Especialista en Oncología Médica, Doctor en Medicina por la Universidad de Málaga;

Dra. Elena Castro Marcos, Licenciada Especialista en Oncología Médica, Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca;

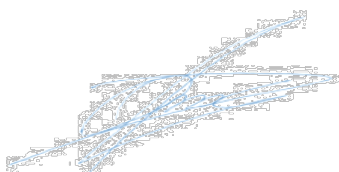
INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización clínica y molecular del cáncer de próstata con alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN”, que presenta la Licenciada en Medicina y Especialista en Oncología Médica, Dña. Rebeca Lozano Mejorada, ha sido realizada bajo su dirección y reúne, a su juicio, los requisitos de calidad, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y pueda optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

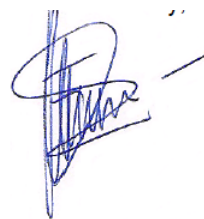
Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Salamanca, a 27 de noviembre de 2023.



Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández



Dr. David Olmos Hidalgo



Dra. Elena Castro Marcos

La presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización clínica y molecular del cáncer de próstata con alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN” es una tesis por compendio de los artículos que se enumeran a continuación, incluyendo la lista de autores y su afiliación:

1. 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 Feb 20;37(6):490-503.

DOI: 10.1200/JCO.18.00358.

Elena Castro^{1,2}, Nuria Romero-Laorden^{1,3}, Ángela del Pozo⁴, Rebeca Lozano^{1,5}, Ana Medina⁶, Javier Puente⁷, Josep María Piulats⁸, David Lorente⁹, María Isabel Saéz^{5,10}, Rafael Morales-Barrera¹¹, Enrique González-Billalabeitia¹², Ylenia Cendón^{1,13}, Iciar García-Carbonero¹⁴, Pablo Borrega¹⁵, M. José Méndez Vidal¹⁶, Álvaro Montesa^{5,10}, Paz Nombela¹, Eva Fernández-Parra¹⁷, Aránzazu González del Alba¹⁸, José Carlos Villa-Guzmán¹⁹, Kristina Ibañez⁴, Alejo Rodríguez-Vida²⁰, Lorena Magraner-Pardo¹, Begoña Pérez-Valderrama²¹, Elena Vallespín⁴, Enrique Gallardo²², Sergio Vázquez²³, Colin C. Pritchard²⁴, Pablo Lapunzina⁴, David Olmos^{1,5}.

1. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España.
2. Hospital Universitario Quiron, Madrid, España.
3. Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España.
4. Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, CIBERER Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
5. Unidad de Investigación Tumores Genitourinarios CNIO-IBIMA, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, España.
6. Centro Oncológico de Galicia, Coruña, España.
7. Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.
8. Institut Català d'Oncologia, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, Barcelona, España.
9. Hospital Universitario La Fe, Valencia, España.
10. Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional de Málaga, Málaga, España.
11. Instituto de Oncología Vall d'Hebron, Hospital Universitario de Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
12. Hospital Morales Messeguer-IMIB, UCAM, Murcia, España.

13. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
14. Hospital Virgen de la Salud, Toledo, España.
15. Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, España.
16. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España.
17. Hospital Universitario de Valme, Sevilla, España.
18. Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España.
19. Hospital Universitario de Ciudad Real, Ciudad Real, España.
20. Hospital del Mar, Barcelona, España.
21. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España.
22. Parc Taulí Hospital Universitari, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí I3PT, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, España.
23. Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, España.
24. University of Washington Medical Center, Seattle, WA.

2. Association between *BRCA2* alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer.

Eur J Cancer. 2021 Apr; 147:74-83.

DOI: 10.1016/j.ejca.2021.01.027.

Rebeca Lozano¹, Daniela C Salles², Shahneen Sandhu³, Isabel M. Aragón¹, Heather Thorne³, Fernando López-Campos⁴, José Rubio-Briones⁵, Ana M. Gutiérrez-Pecharroman⁶, Laneisha Maldonado², Tomas di Domenico⁷, Alejandro Sanz⁸, Juan D. Prieto⁹, Isabel García⁹, María I. Pacheco⁸, Teresa Garcés¹, Casilda Llácer¹⁰, Nuria Romero-Laorden¹¹, Francisco Zambrana¹², Pedro P. López-Casas⁸, David Lorente¹³, Joaquín Mateo¹⁴, Colin C. Pritchard¹⁵, Emmanuel S. Antonarakis¹⁶, David Olmos¹, Tamara L. Lotan¹⁷, Elena Castro¹⁸.

1. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid. Unidad de Investigación Traslacional en Tumores Genitourinarios, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), España.
2. Department of Pathology, John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.
3. Medical Oncology, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia.
4. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, CNIO. Radioterapia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España.
5. Departamento de Urología, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España.
6. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, CNIO. Madrid. Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Getafe, Getafe, España.
7. Unidad de Bioinformática, CNIO, Madrid, España.
8. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, CNIO, Madrid, España.
9. Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, España.
10. Unidad de Investigación Traslacional en Tumores Genitourinarios, IBIMA. Departamento de Oncología, Hospitales Universitario Virgen de la Victoria y Regional de Málaga, Málaga, España.
11. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España.
12. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario Infanta Sofía, Madrid, España.
13. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, CNIO, Madrid. Departamento de Oncología Médica, Hospital Provincial de Castellón, Castellón de la Plana, España.
14. Unidad de Investigación Traslacional en Cáncer de Próstata, Instituto de Oncología Vall d'Hebron, Barcelona, España.

15. University of Washington Medical Center, Seattle, USA.
16. Medical Oncology, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.
17. Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.
18. Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Próstata, CNIO, Madrid. Unidad de Investigación Traslacional en Tumores Genitourinarios, IBIMA, Málaga. Departamento de Oncología Médica, Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional de Málaga, Málaga, España.

3. Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline *BRCA2* mutation carriers.

Eur J Cancer. 2023 May; 185:105-118.

DOI: 10.1016/j.ejca.2023.02.022.

Rebeca Lozano¹, Elena Castro², Fernando López-Campos³, Heather Thorne⁴, Miguel Ramírez-Backhaus⁵, Isabel M. Aragón⁶, Ylenia Cendón-Flórez⁶, Ana Gutiérrez-Pecharroman⁷, Daniela C. Salles⁸, Nuria Romero-Laorden⁹, David Lorente¹⁰, Pilar González-Peramato¹¹, Ana Calatrava¹², Concepción Alonso¹³, Urbano Anido¹⁴, Sara Arévalo-Lobera¹⁵, Judith Balmaña¹⁶, Isabel Chirivella¹⁷, María José Juan-Fita¹⁸, Gemma Llorca¹⁹, Teresa Ramón y Cajal²⁰, Elena Almagro²¹, Daniel Alameda⁶, Pedro P. López-Casas²², Bernardo Herrera²³, Joaquín Mateo¹⁶, Clin C. Pritchard,² Emmanuel S. Antonarakis²⁵, Tamara L. Lotan⁸, José Rubio-Briones⁵, Shahneen Sandhu²⁶, David Olmos²².

1. Unidad de Investigación Traslacional de Tumores Genitourinarios, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.
2. Unidad de Investigación Traslacional de Tumores Genitourinarios, (IBIMA), Málaga. Translational Cancer Genetics Group, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España.
3. Departamento de Oncología Radioterapia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España.
4. kConFab, The Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia.
5. Departamento de Urología, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España.
6. Unidad de Investigación Traslacional de Tumores Genitourinarios, (IBIMA), Málaga, España.
7. Unidad de Investigación Traslacional de Tumores Genitourinarios, (IBIMA), Málaga. Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Getafe, Getafe, España.
8. Department of Pathology, John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.
9. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España.
10. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Castellón, Castellón de la Plana, España.
11. Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
12. Departamento de Anatomía Patológica, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España.
13. Departamento de Genética, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, España.
14. Departamento de Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España.

15. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario de Donostia, Donostia, España.
16. Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona. Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España.
17. Departamento de Oncología Médica, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, España.
18. Departamento de Oncología Médica, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España.
19. Departamento de Oncología Médica, Parc Tauli Hospital Universitari, Sabadell, España.
20. Departamento de Oncología Médica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.
21. Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario Quiron, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España.
22. Genomics and Therapeutics in Prostate Cancer Group, Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Sanitaria 12 de Octubre (imas12), Madrid, España.
23. Unidad de Investigación Traslacional de Tumores Genitourinarios, (IBIMA), Málaga. Departamento de Urología, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, España.
24. Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, USA.
25. Department of Medical Oncology, John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA:
26. Sir Peter MacCallum Department of Oncology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.

Los resultados de este trabajo también han sido objeto de otras publicaciones en revistas y presentaciones en los siguientes congresos científicos:

- ***Genetic aberrations in DNA repair pathways: a cornerstone of precision oncology in prostate cancer.***

Revisión publicada en: British Journal of Cancer, 2021 Feb;124(3):552-563.

DOI: 10.1038/s41416-020-01114-x.

- 2018 ASCO (American Society of Clinical Oncology) Genitourinary Cancers Symposium, ASCO GU, 8-10 febrero 2018, San Francisco, California (EE. UU.).

Rapid-fire communication, Prostate Cancer. Abstract 164

Título: *Comparative assessment of Abiraterone and Enzalutamide activity in the PROREPAIR-B Study*

Publicado en: Journal of Clinical Oncology 36 (6_suppl). 164-164.

Trabajo merecedor de Premio: Merit Award

- 2018 Congreso SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica); 25-28 septiembre 2018, Madrid, España

Comunicación Oral, Sesión de Genitourinario. Abstract O-32

Título: *Prevalencia de mutaciones germinales en genes reparadores del ADN e impacto de la historia familiar en pacientes con CPRCm dentro del estudio PROREPAIR-B*

Trabajo merecedor de Premio: Mejor Comunicación Oral

- 2018 Congreso SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica)
25-28 septiembre 2018, Madrid, España

Poster Destacado. Abstract P-21

Título: *Impacto de la secuencia de tratamiento en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm) portadores de mutación en BRCA2: subanálisis del estudio PROREPAIR-B*

- 2019 ASCO (American Society of Clinical Oncology) Genitourinary Cancers Symposium, ASCO GU, 14-16 febrero 2019, San Francisco, California (EEUU).

Poster Presentation, Prostate Cancer. Abstract 264

Título: *Impact of treatment sequence in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) on outcome in a prospective cohort study*

Publicado en: Journal of Clinical Oncology 37 (7_suppl). 264-264.

Trabajo merecedor de Premio: Merit Award

- 2020 ASCO Annual Meeting (American Society of Clinical Oncology)
29 mayo - 2 junio 2020, Virtual Meeting (Covid-19)

Poster discussion, Prostate Cancer. Abstract 5511

Título: *PROREPAIR-A: Clinical and molecular characterization study of prostate cancer (PC) patients with and without previously known germline BRCA1/2 mutations*

Publicado en: Journal of Clinical Oncology, 38 (15_suppl). 5511-5511.

Trabajo merecedor de Premio: Merit Award

- 2020 ESMO Virtual Congress (European Society of Medical Oncology)

19-21 septiembre 2020, Virtual

Mini-Oral Communication, Genitourinary tumours, prostate. Abstract 612MO

Título: *Clinical impact of somatic alterations in prostate cancer patients with and without previously known germline BRCA1/2 mutations: Results from PROREPAIR- A study*

Publicado en: *Annals of Oncology*, 31 (4): S509-S510

- 2020 Congreso SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica)

19-23 octubre 2020, Virtual

Comunicación Oral, Sesión de Genitourinario. Abstract O-12

Título: *Caracterización clínica y molecular de pacientes con cáncer de próstata con y sin mutaciones germinales en BRCA2*

- **Premios**

Los trabajos presentados en 2018 ASCO Genitorinary Cancers Symposium, en 2019 ASCO Genitorinary Cancers Symposium y 2020 ASCO Annual Meeting fueron merecedores de Merit Award.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han contribuido de una forma u otra a la realización de esta tesis doctoral, un proyecto que ha representado un desafío desde el punto de vista profesional y personal.

En primer lugar, a mis directores de tesis. A Juan Jesús Cruz, quien desempeñó un papel fundamental como mi primer mentor en el mundo de la investigación. Has sido la chispa que encendió mi interés por la investigación y has guiado mis primeros pasos en este mundo. Aprecio mucho la confianza que depositaste en mí desde el principio.

A David Olmos y Elena Castro, la piedra angular de este proyecto. Habéis sido más que directores: habéis sido mentores, fuente constante de inspiración. Trabajar a vuestro lado es un verdadero privilegio. Gracias por compartir vuestra pasión y conocimientos, y por inculcarme la importancia de la curiosidad y la perseverancia en la investigación. Por dedicarme tiempo, ese que tanto os falta. Gracias por apretar tanto, impulsándome a alcanzar metas que nunca imaginé posibles. Y, sobre todo, gracias por saber soltar en los momentos complicados.

A mis compañeras de “la pecera” en CNIO. Los momentos compartidos en torno a los cafés fueron pausas necesarias, pero también momentos de risas y complicidad que hicieron mis años en Madrid más llevaderos. Hicisteis que “la pecera” se convirtiera en un espacio más allá que un simple lugar de trabajo. Gracias por el apoyo cuando la frustración venía a sentarse a mi lado.

Un agradecimiento especial se dirige a mis amigos repartidos por diferentes lugares (Salamanca, Madrid, Vitoria, Elche y Mallorca), quienes son mi red de apoyo continuo. Gracias por ser y estar. Me siento afortunada de teneros en mi vida, os aprecio más de lo que las palabras pueden expresar.

A la familia Caminero-Amores por ser refugio seguro y un sostén fundamental en mi vida. Gracias por vuestra generosidad y cariño. Gracias Arantxa, por mirarme tan bien. El último empujón de este trabajo no habría sido posible sin tu apoyo. No me olvido de quien me dio la mano cuando se me caía el mundo.

Mis padres y mis hermanos merecen el mayor de los reconocimientos por su amor y apoyo constante a lo largo de este largo trayecto. Papá, mamá: gracias por sacrificar tantas cosas para invertir en nuestra educación.

Y, sobre todo, gracias a los pacientes. Por y para vosotros.

“Solo aprende quien admira”

Miki Naranja

ÍNDICE

Listado de abreviaturas

INTRODUCCIÓN

1	Epidemiología del cáncer de próstata.....	1
2	Clasificación del cáncer de próstata	3
3	Clasificación histológica del cáncer de próstata	5
3.1	Gleason Score	6
3.2	Patrón cribiforme.....	7
3.3	Carcinoma intraductal	8
4	Estratificación del riesgo en enfermedad localizada	10
5	Abordaje terapéutico del cáncer de próstata.....	11
5.1	Tratamiento del cáncer de próstata localizado	11
5.1.1	Actitud expectante y vigilancia activa	11
5.1.2	Prostatectomía radical y radioterapia	12
5.2	Tratamiento del cáncer de próstata avanzado.....	13
6	Heterogeneidad molecular en cáncer de próstata	20
7	Vías de reparación del ADN en cáncer de próstata	23
7.1	Vías de reparación del ADN.....	23
7.2	Prevalencia de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata	27
7.3	Implicaciones clínicas de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata.....	32
7.3.1	Cáncer de próstata localizado.....	32
7.3.2	Cáncer de próstata metastásico hormonosensible y resistente a la castración	33
7.4	Alteraciones en genes de la reparación del ADN como diana terapéutica.....	36
7.4.1	Quimioterapia basada en sales de platino	36
7.4.2	Inhibidores de PARP y letalidad sintética.....	37

7.4.2.1.	TOPARP-A y TOPARP-B.....	37
7.4.2.2.	PROFOUND.....	38
7.4.2.3.	TRITON2 y TRITON3	39
7.4.2.4.	GALAHAD.....	40
7.4.3	Combinaciones de inhibidores de PARP e inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos.....	42
7.4.4	Otras estrategias de tratamiento	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		50
MATERIAL Y MÉTODOS		
1	Procedimientos de los estudios	55
2	Recogida de datos clínicos	55
3	Recogida, almacenamiento y envío de muestras	56
4	Procedimientos experimentales.....	57
4.1	Análisis de variantes en ADN germinal	57
4.2	Caracterización molecular de muestras parafinadas.....	61
4.2.1	Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	62
4.2.2	Secuenciación de genoma completo a baja cobertura (LP-WGS)	71
4.3	Análisis histopatológico de muestras parafinadas.....	77
5	Análisis estadístico.....	79
RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
1	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	85
2	Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline <i>BRCA2</i> mutation carriers.....	100
3	Association between <i>BRCA2</i> alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer.	111
CONCLUSIONES.....		123
BIBLIOGRAFÍA.....		127

ARTÍCULOS

- 1. 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**
 - 1.1. Resumen en castellano.....178
- 2. Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline *BRCA2* mutation carriers**
 - 2.1. Resumen en castellano.....195
- 3. Association between *BRCA2* alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer**
 - 3.1. Resumen en castellano.....208

Listado de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico	CPHSm:	Cáncer de próstata hormonosensible
ADNtc:	ADN tumoral circulante		metastásico
APEX1:	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1 gene</i>	CPRCm:	Cáncer de próstata resistente a la castración metastásico
APEX2:	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 2 gene</i>	CPRCnm:	Cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico
APLF:	<i>Aprataxin And PNKP Like Factor gene</i>	CRIB:	Cribiforme
ARSi:	<i>Androgen Receptor Signalling inhibitor</i>	DA:	Deprivación Androgénica
ATM:	<i>Ataxia telangiectasia mutated gene</i>	DDR:	<i>DNA Damage Response and Repair</i>
ATR:	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related gene</i>	DSB:	<i>Double-strand breaks</i>
BARD1:	<i>BRCA1 Associated Ring Domain 1 gene</i>	ECOG:	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
BER:	<i>Base-excision repair</i>	EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
BRCA1:	<i>Breast Cancer 1 gene</i>	EMA:	<i>European Medicines Agency</i>
BRCA2:	<i>Breast Cancer 2 gene</i>	EPCAM:	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule gene</i>
BRIP1:	<i>BRCA1 associated C- terminal helicase gene</i>	FANCA:	<i>Fanconi Anemia complementation group A gene</i>
CDK12:	<i>Cyclin dependent kinase 12 gene</i>	FANCB:	<i>Fanconi Anemia complementation group B gene</i>
CDK7:	<i>Cyclin dependent kinase 7 gene</i>	FANCC:	<i>Fanconi Anemia complementation group C gene</i>
CHEK1:	<i>Checkpoint kinase 1 gene</i>		
CHEK2:	<i>Checkpoint kinase 2 gene</i>		
CNIO:	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas		
CNV:	<i>Copy Number Variation</i>		

FANCD2:	<i>Fanconi Anemia complementation group (D2) gene</i>	NEHJ:	<i>Non-homologous end-joining</i>
FANCE:	<i>Fanconi Anemia complementation group E gene</i>	NER:	<i>Nucleotid-excision repair</i>
FANCF:	<i>Fanconi Anemia complementation group F gene</i>	NGS:	Next-generation sequencing
FANCG:	<i>Fanconi Anemia complementation group G gene</i>	PALB2:	<i>Partner And Localizer Of BRCA2 gene</i>
FFPE:	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>	PARP:	Poli-ADP-ribosa polimerasa
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	PCWG2:	<i>Prostate Cancer Working Group 2</i>
gBRCA2:	Mutaciones germinales en <i>BRCA2</i>	PIN:	Neoplasia Intraepitelial de Alto Grado
GGO:	Gammagrafía ósea	PMS2:	<i>PMS1 Homolog 2 gene</i>
HE:	Hematoxilina- eosina	PSA:	Antígeno Prostático Específico
HR:	<i>Hazard ratio</i>	PSMA:	<i>Prostate-Specific Membrane Antigen</i>
HRR:	<i>Homologous recombination repair</i>	RA:	Receptor de Andrógenos
IDC:	Carcinoma intraductal	RAD51B:	<i>RAD51 paralog B gene</i>
iPARP:	Inhibidores de PARP	RAD51C:	<i>RAD51 homolog C gene</i>
ISUP:	<i>International Society of Urological Pathology</i>	RAD51D:	<i>RAD51 paralog D gene</i>
LHRH:	Hormona liberadora de gonadotropina	RAD54B:	<i>RAD54 paralog B gene</i>
LP-WGS:	<i>Low-Pass Whole Genome Sequencing</i>	RH:	Recombinación Homóloga
MLH1:	<i>MutL homolog 1 gene</i>	RM:	Resonancia magnética
MLH1:	<i>MutS homolog 6 gene</i>	SG:	Supervivencia global
MMR:	<i>Mismatch repair</i>	SLM:	Supervivencia libre de metastásis
MSH2:	<i>MutS homolog 2 gene</i>	SLPr:	Supervivencia libre de progresión radiológica
NCCN:	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	SSB:	Single-strand breaks
		SU2C/PCF:	<i>Stand up to Cancer/Prostate Cancer Foundation Team</i>
		TC:	Tomografía computarizada
		TCGA:	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
		TDA:	Terapia de privación androgénica

TMA: *Tissue Microarrays*
TRC: Tiempo a la resistencia a
castración
WHO: *World Health Organization*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 Epidemiología del cáncer de próstata

A nivel mundial, la incidencia del cáncer de próstata se estima en torno a 1.400.000 casos nuevos/año, convirtiéndolo en el segundo tumor más frecuente en varones, por detrás del cáncer de pulmón y representando el 14,1% de todos los tumores en el sexo masculino¹⁻³.

La incidencia varía ostensiblemente en función del área geográfica, de tal manera que las tasas ajustadas por edad más elevadas se encuentran en Europa del norte y Occidental (83,4/100.000 y 77,6/100.000 habitantes/año, respectivamente), Australia y Nueva Zelanda (75,8/100.000 habitantes/año) y América del Norte (73/100.000 habitantes/año). Por el contrario, África y Asia tienen tasas de incidencia inferiores a las de los países desarrollados (por debajo de los 30 casos/100.000 habitantes/año)⁴ (Figura 1). Estas variaciones mundiales en la incidencia del cáncer de próstata podrían atribuirse en parte a la realización de cribado de PSA⁵. Diferentes estudios han demostrado que alrededor del 20-40% de los casos de cáncer de próstata en EE. UU. y Europa, dos de los lugares con mayor incidencia a nivel mundial, podrían deberse a un sobrediagnóstico secundario a cribados masivos de PSA⁵⁻⁷. Sin embargo, existen otros muchos elementos que juegan un importante papel a la hora de explicar estas diferencias, como son los factores ambientales o la disparidad en el acceso a la atención médica, entre otros.

En España, se diagnostican unos 29.000 casos al año, siendo el primer tumor más frecuente en varones, con una incidencia estimada estandarizada de 70,6/100.000 habitantes/año, una cifra superior a la estimada para todo el continente europeo^{4,8}.

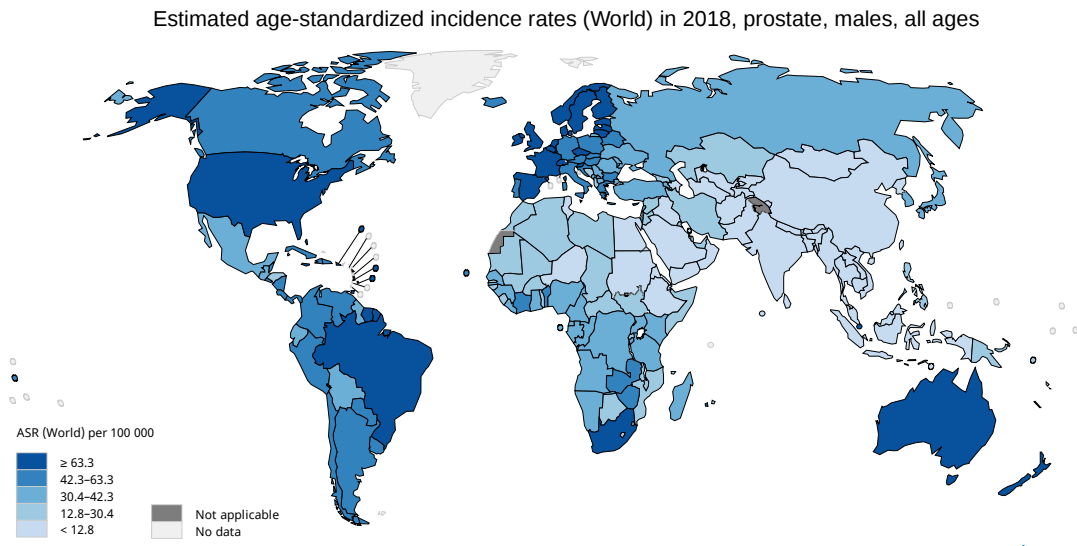


Figura 1: Variación internacional de las tasas de incidencia de cáncer de próstata estandarizadas por edad. ASR – Tasa estandarizada por edad. Fuente: GLOBOCAN 2020 ⁴

La mortalidad del cáncer de próstata está condicionada por multitud de factores, pero uno de los más importantes es la extensión del tumor en el momento del diagnóstico. Así, la supervivencia relativa a 5 años entre pacientes con un diagnóstico localizado puede llegar a ser cercana al 100%, mientras que en aquellos con enfermedad metastásica *de novo*, los porcentajes descienden notablemente (30%) ⁹.

Se estima que en todo el mundo se producen alrededor de 375.000 muertes anuales por cáncer de próstata, lo que lo convierte en la sexta causa de muerte por cáncer en varones ^{1,2}.

Al igual que la incidencia, las tasas de mortalidad por cáncer de próstata varían considerablemente a lo largo de todo el mundo (Figura 2). En 2020, las más elevadas se registraron en África (16,3/100.000 habitantes/año), seguida de América Latina (14,2/100.000 habitantes/año) y Europa (11,1/100.000 habitantes/año).

En España fallecen alrededor de 5.800 hombres por cáncer de próstata al año, lo cual supone un 9% de todas las muertes por cáncer en varones. Es la tercera causa de muerte por cáncer en el sexo masculino, por detrás del cáncer de pulmón y el colorrectal ⁸.

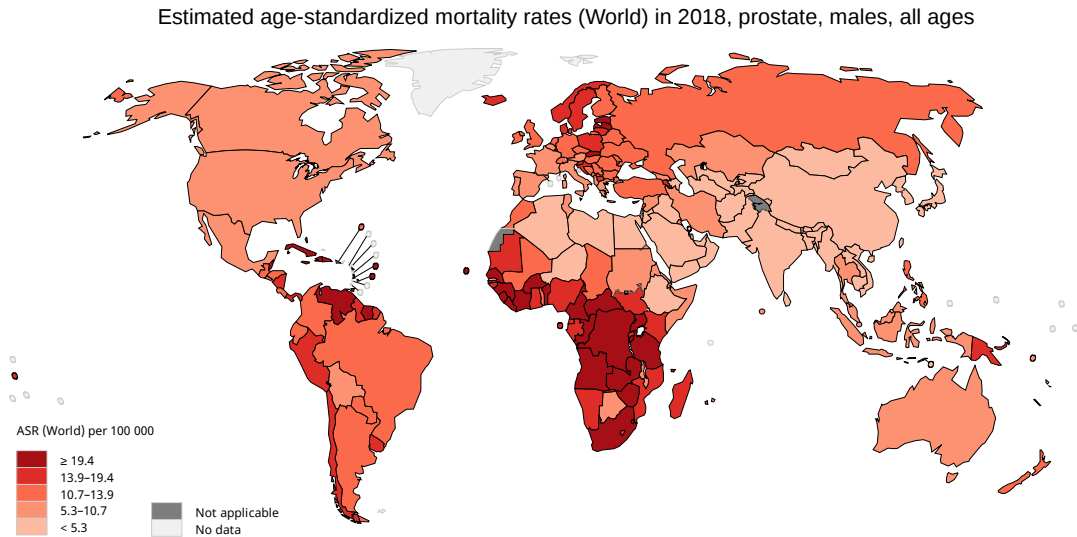


Figura 2: Variación internacional de las tasas de mortalidad por cáncer de próstata estandarizadas por edad. ASR – Tasa estandarizada por edad. Fuente: GLOBOCAN 2020 ⁴

Sin embargo, es importante destacar que las tasas de mortalidad por cáncer de próstata han disminuido a lo largo de los últimos años, especialmente en América del Norte y en Europa occidental y septentrional^{10,11}. Este descenso en la tendencia de mortalidad puede ser el reflejo de las mejoras acontecidas en los tratamientos, incluida la cirugía, la radioterapia y los tratamientos sistémicos, así como el mayor acceso a las mismas ^{12,13}.

2 Clasificación del cáncer de próstata

Actualmente, el sistema de clasificación TNM de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) es el más usado. En ella, la extensión del tumor se clasifica en función del tumor primario (T), la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). En el caso del cáncer de próstata, esta clasificación también incorpora el grado histológico (Gleason score) y el PSA basal (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación TNM para el cáncer de próstata, 8th Ed. AJCC

Tumor primario (T)	
Categoría clínica (cT)	Criterio
cTx	Tumor primario no evaluado
cT0	No evidencia de tumor primario
cT1	Tumor clínicamente no aparente y no palpable
cT1a	Hallazgo histológico incidental en ≤5% del tejido
cT1b	Hallazgo histológico incidental en >5% del tejido
cT1c	Tumor identificado por biopsia uni o bilateral, pero no palpable
cT2	Tumor palpable, confinado en la próstata
cT2a	Tumor que involucra la mitad de un lóbulo o menos
cT2b	Tumor que involucra más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos
cT2c	Tumor que involucra ambos lóbulos
cT3	Extensión extrapróstática sin invasión de estructuras adyacentes
cT3a	Extensión extrapróstática (uni o bilateral)
cT3b	Invasión de vesícula/s seminal/es
cT4	Invasión de estructuras adyacentes que no sean las vesículas Seminales (esfínter externo, recto, vejiga, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica)
Categoría patológica (pT)	Criterio
pT2	Tumor limitado a la próstata
pT3	Extensión extrapróstática
pT3a	Extensión extrapróstática (uni o bilateral) o invasión microscópica del cuello de vejiga.
pT3b	Invasión de vesícula/s seminal/es
pT4	Invasión de otras estructuras adyacentes que no sean las vesículas seminales (esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano, pared pélvica)
Ganglios linfáticos regionales (N)	Criterio
Nx	Ganglios regionales no evaluados
N0	Ausencia de metástasis en ganglios regionales
N1	Metástasis ganglionar/es regional/es

Metástasis a distancia (M)	Criterio
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Ganglio/s linfático/s no regional/es
M1b	Metástasis ósea/s
M1c	Otras localizaciones (viscerales) con/sin afectación ósea

T	N	M	PSA	Grupo Gleason	Estadio
cT1a-c, cT2a	N0	M0	<10	Grado 1	I
pT2	N0	M0	<10	Grado 1	I
cT1a-c, cT2a, pT2	N0	M0	≥10 <20	Grado 1	IIA
cT2b-c	N0	M0	<20	Grado 1	IIA
T1-2	N0	M0	<20	Grado 2	IIB
T1-2	N0	M0	<20	Grado 3/4	IIC
T1-2	N0	M0	≥20	Grado 1 a 4	IIIA
T3-4	N0	M0	Cualquier PSA	Grado 1 a 4	IIIB
Cualquier T	N0	M0	Cualquier PSA	Grado 5	IIIC
Cualquier T	N1	M0	Cualquier PSA	Cualquier grado	IVA
Cualquier T	Cualquier N	M1	Cualquier PSA	Cualquier grado	IVB

3 Clasificación histológica del cáncer de próstata

El 95% de los tumores de próstata son adenocarcinomas, de los cuales, la gran mayoría son acinares. Estos se caracterizan por la presencia de células malignas en forma cuboidal y/o columnar que forman acinos y túbulos.

El adenocarcinoma ductal supone menos del 1% de los tumores de próstata en su forma pura, y menos del 5% en su forma asociada a un adenocarcinoma acinar. Se desarrolla a expensas de los ductos prostáticos periféricos¹⁴, y es un tumor infiltrante, y por tanto debe diferenciarse del carcinoma intraductal. Está constituido por células cilíndricas atípicas, dispuestas en forma de grandes masas de estructura papilar o cribiforme. El adenocarcinoma ductal suele estar asociado a patrones de alto grado (grupo ISUP 4 o 5), y tiene un comportamiento más agresivo en términos de diseminación a distancia o supervivencia causa-específica^{15,16}.

Existen otros subtipos histológicos menos frecuentes, entre los que se encuentran aquellos con diferenciación neuroendocrina, sarcomatoide, carcinomas escamosos o linfoepitelioma-like, entre otros¹⁷. En algunos casos se pueden describir adenocarcinomas mixtos con áreas focales con otras diferenciaciones.

3.1 Gleason Score

El Gleason Score o gradación de Gleason es un sistema que identifica los patrones de crecimiento en los adenocarcinomas de próstata, que se clasifican del 1 al 5, representando una escala progresiva decreciente de diferenciación glandular. Para reflejar la heterogeneidad del cáncer de próstata, la puntuación de Gleason se obtiene mediante la suma de los dos grados más prevalentes definidos por criterios estructurales, siendo el Gleason primario el patrón mayoritario y el Gleason secundario el segundo más prevalente en términos de volumen¹⁸. Actualmente, las puntuaciones compuestas de 2 a 5 no son consideradas como cáncer de próstata, por lo que el rango de puntuaciones de Gleason se clasifica de 6 (3+3) a 10 (5+5).

La Sociedad Internacional de Patología Urológica (*International Society of Urological Pathology* [ISUP]), en el consenso llevado a cabo en 2014^{19,20}, estableció una nueva clasificación de este sistema en 5 categorías o grupos:

- Grupo 1: Puntuación de Gleason 6 (3+3)
- Grupo 2: Puntuación de Gleason 7, con patrón 3 mayoritario (3+4)
- Grupo 3: Puntuación de Gleason 7, con patrón 4 mayoritario (4+3)
- Grupo 4: Puntuación de Gleason 8 (4+4, 3+5 o 5+3)
- Grupo 5: Puntuación de Gleason 9 o 10 (4+5, 5+4 o 5+5)

Actualmente, esta agrupación es la más empleada y ha sido incluida dentro de la nueva clasificación de cáncer de próstata de la WHO (*World Health Organization*) de 2022²¹.

El valor pronóstico de esta clasificación ha sido validado retrospectivamente, con más de 20.000 pacientes sometidos a prostatectomía radical, demostrando que la supervivencia libre de progresión bioquímica a 5 años tras prostatectomía radical fue del 96%, 88%, 63%, 48% y 26% para los grupos 1 a 5 respectivamente²². (Figura 3)

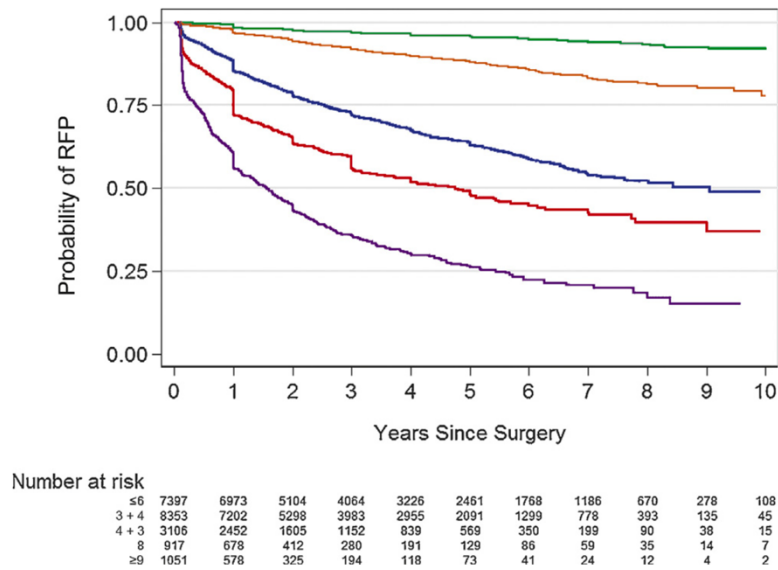


Figura 3: Supervivencia libre de recurrencia tras prostatectomía radical estratificado por el grupo pronóstico de Gleason. Línea verde: Grupo 1 (Gleason 6). Línea naranja: Grupo 2 (Gleason 3+4). Línea azul oscura: Grupo 3 (Gleason 4+3). Línea marrón: Grupo 4 (Gleason 8). Línea gris: Grupo 5 (Gleason ≥ 9). Fuente: Epstein JJ, Eur Urol 2016²².

3.2 Patrón cribiforme

El Gleason 4 es un grupo heterogéneo de variantes morfológicas que incluyen: (i) glándulas mal formadas, (ii) estructuras glomerulares, (iii) glándulas cribiformes y (iv) glándulas fusionadas (Figura 4)²³. Cada una de estas entidades, aunque agrupadas dentro del Gleason 4, tienen diferente significado clínico. De todos ellos, la presencia de patrón cribiforme es la que está asociada a un pronóstico más adverso²⁴⁻²⁶. Diferentes estudios han demostrado que la presencia de patrón cribiforme en pacientes sometidos a tratamiento radical (o bien cirugía o bien radioterapia) se asocia a menor supervivencia libre de metástasis^{24,27}. Por ello, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) ha recomendado su inclusión en los informes de anatomía patológica²⁸. De forma reciente se ha demostrado, además, que esta entidad se asocia a una mayor inestabilidad genómica, lo cual podría explicar, en parte, el mal pronóstico que presentan estos pacientes²⁹⁻³¹.

Con el fin de mejorar el acuerdo entre patólogos en cuanto al diagnóstico de este patrón, ya que en ocasiones puede ser difícil de diferenciar del carcinoma intraductal (ver más adelante, sección 3.3., Tabla 2), se ha redactado una definición consensuada: la arquitectura cribiforme se caracteriza por una proliferación sólida expansiva, similar a un tamiz, de células epiteliales malignas que adoptan la apariencia de “glándulas dentro de glándulas”.

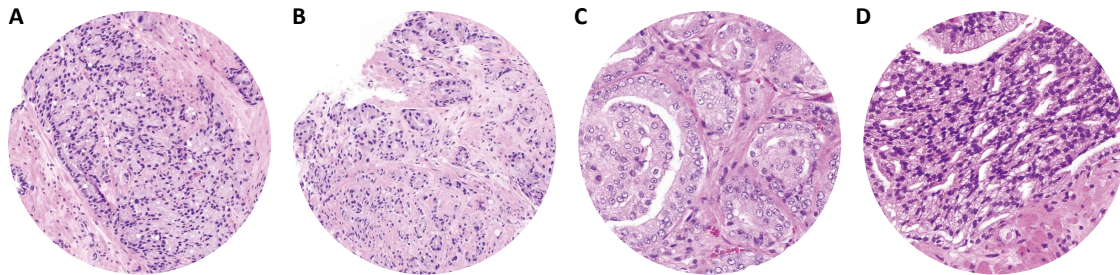


Figura 4: Representación de las diferentes variantes morfológicas dentro del Gleason 4. A) Patrón Gleason 4 con glándulas mal formadas; B) Patrón Gleason 4 con estructuras glomerulares; C) Patrón Gleason 4 con glándulas cribiformes; D) Patrón Gleason 4 con glándulas fusionadas. Figura modificada de: *Hassan O. Transl Androl Urol, 2018*²³.

3.3 Carcinoma intraductal

El carcinoma intraductal (IDC) es una entidad recientemente descrita^{32,33}, que, aunque no está incluida en el sistema de clasificación de Gleason, se ha asociado a mayor agresividad loco-regional, patrones más altos de Gleason (grados 4 y 5)^{25,34-36}, mayor riesgo de recidiva bioquímica, de metástasis y mortalidad^{25,36,37}. Es importante destacar que la presencia de esta histología se ha reportado de forma más frecuente en pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* y otros genes relacionados con la reparación del ADN en comparación con tumores esporádicos³⁸⁻⁴⁰. En base a estos datos, aunque la evidencia es limitada, las guías clínicas americanas NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) recomendaron que se debía considerar la realización de cribado genético a todos los pacientes con cáncer de próstata de riesgo intermedio con histología intraductal/cribiforme independientemente de la historia familiar⁴¹.

Desde un punto de vista histológico se define como una proliferación epitelial neoplásica llenando los conductos glandulares (intraductal) o las estructuras terminales acinares (intracinar), con la peculiaridad de preservar las células basales, formando a su vez: (i) patrones cribiformes sólidos o densos o (ii) un patrón cribiforme laxo o patrón micropapilar con atipia nuclear marcada (aumento (x6) del tamaño nuclear normal) o comedonecrosis no focal ³².

La controversia radica en la dificultad para distinguir esta entidad de la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), o del propio patrón cribiforme (Tabla 2), ya que pueden superponerse, e incluso en el caso del patrón cribiforme, en muchas ocasiones co-existir ^{42,43}. De forma similar al IDC, el PIN tiene un patrón no invasivo. Sin embargo, el IDC tiene un componente de adenocarcinoma invasivo coexistente en el 90-100% de los casos, a diferencia del PIN, cuya asociación con un carcinoma invasivo es mucho menor. El IDC en muchos casos representa un adenocarcinoma prostático en el que las células se han propagado hacia los conductos y los acinos.

Tabla 2: Principales diferencias histopatológicas entre los patrones de carcinoma intraductal (IDC), neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) o cribiforme.

	IDC	PIN	Cribiforme
Glándulas	Grandes e irregulares	Grandes y regulares	Pequeñas y abigarradas
Crecimientos epiteliales	Papilares, cribiformes, sólidos	Papilares, cribiformes, sólidos	Cribiformes
Atipia	Marcada	Moderada o marcada	Leve o moderada
Tamaño nuclear	x6 respecto al tamaño normal	3 veces superior	2 veces superior
Células basales	Presentes	Presentes	Ausentes
Mitosis	Presentes	Ausentes o mínimas	Escasas
Necrosis	Presente	Ausente	Ausente
Carcinoma asociado	90-100%	Puede existir o no	Es un carcinoma infiltrante

4 Estratificación del riesgo en enfermedad localizada

Los pacientes diagnosticados de cáncer de próstata con estadio localizado o localmente avanzado pueden clasificarse en subgrupos de riesgo o pronóstico según diferentes escalas. La clasificación desarrollada por D'Amico es una de las más empleadas ⁴⁴, aunque existen otras: clasificación NCCN ⁴¹, UCSF-CAPRA ⁴⁵, etc. En la clasificación de D'Amico se categoriza a los pacientes en tres grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto, en función de las cifras de PSA, el Gleason Score y el estadio clínico (Tabla 3). Este sistema permite tomar decisiones a la hora de plantear el tratamiento inicial de los pacientes.

Tabla 3: Clasificación de grupos de riesgo según D'Amico

Riesgo	Tamaño (T)		Gleason		PSA
Bajo	cT1-cT2a	y	≤6 (3+3) (ISUP 1)	y	≤10 ng/mL
Intermedio	cT2b	o	7 (4+3 o 3+4) (ISUP 2/3)	o	>10 a ≤20 ng/mL
Alto	cT2b-T3	o	≥8 (4+4) (ISUP 4/5)	o	>20 ng/mL

5 Abordaje terapéutico del cáncer de próstata

5.1 Tratamiento del cáncer de próstata localizado

Existen diferentes opciones para abordar el tratamiento del cáncer de próstata localizado, no existiendo actualmente un consenso sobre el manejo óptimo en estos casos. Para realizar una adecuada recomendación terapéutica, no solamente es necesario considerar el grupo de riesgo como se ha comentado previamente, sino que también se deben tener en cuenta las comorbilidades y preferencias del paciente, para lo cual es fundamental informarle debidamente sobre las diversas opciones y sus posibles efectos secundarios.

5.1.1 Actitud expectante y vigilancia activa

Con el objetivo de disminuir los riesgos de un posible sobretreatmento en determinados pacientes, existen dos estrategias conservadoras: la actitud expectante y la vigilancia activa (Tabla 4). La primera de ellas, también conocida como “*watchful waiting*”, hace referencia al tratamiento conservador de los pacientes considerados no aptos para un tratamiento curativo debido a su limitada esperanza de vida y/o comorbilidades. En estos casos, se realiza un seguimiento para detectar la aparición de síntomas relacionados con la enfermedad, en cuya situación se proporciona un tratamiento paliativo, con el fin de mantener la calidad de vida. Por el contrario, la vigilancia activa o “*active surveillance*” tiene por objetivo evitar o demorar un tratamiento radical en pacientes que no requieren abordaje inmediato, pero con el fin de

indicar un tratamiento curativo en el momento adecuado en aquellos casos que así lo requieran ⁴⁶. Para ello los pacientes se someten a un protocolo de estrecha vigilancia y seguimiento. La gran mayoría de guías clínicas reflejan que la vigilancia activa es la opción preferida en una gran parte de los sujetos con cáncer de próstata localizado de bajo riesgo ^{41,47-49}.

Tabla 4: Diferencias entre vigilancia activa y actitud expectante. Modificada de EAU Guidelines.

	VIGILANCIA ACTIVA	ACTITUD EXPECTANTE
Intención tratamiento	Curativo	Paliativo
Seguimiento	Calendario predefinido	Específico para cada paciente
Técnicas	TR, PSA, Bx, RMNmp	No definido
Esperanza de vida	> 10 años	< 10 años
Objetivo	↓Toxicidad del tratamiento SIN compromiso de SG	↓Toxicidad del tratamiento
Comentarios	Sólo subgrupo Muy Bajo – Bajo Riesgo	Todos estadios

Abreviaturas: TR – Tacto Rectal; PSA – Antígeno Prostático Específico; Bx – Biopsia; RMNmp – Resonancia Magnética Nuclear multiparamétrica; SG – Supervivencia Global.

5.1.2 Prostatectomía radical y radioterapia

Por otra parte, dentro de los tratamientos con intención curativa se encuentran la prostatectomía radical y la radioterapia, que a su vez puede ser externa o interna (braquiterapia). Hay que tener en cuenta que en el caso de la radioterapia es preciso asociar un tratamiento hormonal -normalmente con análogos LHRH-, bien sea neoadyuvante y/o adyuvante en aquellos casos de intermedio (período entre 4-6 meses) y alto riesgo (período entre 24-36 meses) ⁵⁰⁻⁵⁹.

El objetivo de cualquiera de estos procedimientos es la erradicación del cáncer, preservando, siempre que sea posible, las funciones de continencia y erección. Ambos

tratamientos (cirugía y radioterapia) ofrecen resultados oncológicos similares ⁶⁰, pero tienen diferentes efectos secundarios. La prostatectomía radical se asocia con un mayor riesgo de incontinencia urinaria y disfunción eréctil, mientras que la radioterapia tiene más probabilidades de causar problemas intestinales ⁶¹. Por tanto, las guías clínicas no establecen cual es el tratamiento más apropiado, sino que recomiendan informar al paciente de todas las opciones ⁶² y tomar una decisión en base a su grupo de riesgo y preferencias.

5.2 Tratamiento del cáncer de próstata avanzado

A pesar de la eficacia de los tratamientos radicales, alrededor del 30% de los pacientes terminarán desarrollando una recurrencia metastásica ^{63,64}, que en la mayoría de los casos evolucionará hacia una situación de resistencia a la castración, la fase letal de esta enfermedad ^{65,66}. Con menor frecuencia (~10%), los pacientes también pueden presentar enfermedad metastásica “*de novo*” ⁶⁷.

El cáncer de próstata avanzado se puede clasificar en tres grandes grupos en base a la presencia/ausencia de metástasis y los niveles de testosterona (Figura 4):

- Cáncer de próstata hormonosensible metastásico (CPHSm), que engloba a aquellos pacientes que presentan niveles normales de testosterona (>50 ng/dL o 1,7 nmol/L) y enfermedad metastásica en pruebas de imagen convencionales (gammagrafía ósea, TC y/o RM). Dentro de este grupo deben distinguirse los pacientes cuya enfermedad metastásica es “*de novo*” o sincrónica y aquellos cuya enfermedad metastásica es metacrónica o recurrente (tras un tratamiento radical previo), debido a que las implicaciones pronósticas de ambos grupos son diferentes ⁶⁸.

- Cáncer de próstata resistente a castración no metastásico (CPRCnm), o M0, en el cual se incluyen aquellos pacientes que presentan niveles de testosterona en rango de castración (<50 ng/dL o 1,7 nmol/L), pero no presentan evidencia de metástasis en pruebas de imagen convencionales (gammagrafía ósea, TC y/o RM). Son pacientes que presentan únicamente progresión bioquímica (elevación de PSA) durante el curso de tratamiento de deprivación de andrógenos.

- Cáncer de próstata resistente a castración metastásico (CPRCm), es la fase final y letal de la enfermedad. En este caso, los pacientes presentan niveles de testosterona en rango de castración y presencia de metástasis en pruebas de imagen.

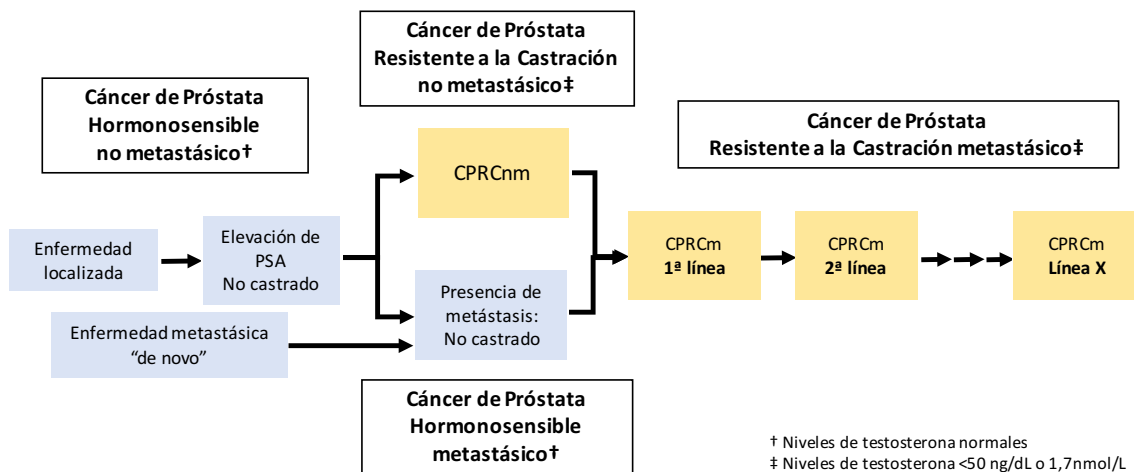


Figura 4: Etapas del cáncer de próstata. Modificado de *Scher et al. J Clin Oncol, 2016* ⁶⁹.

En los últimos años, los avances en el conocimiento de la biología molecular (ver sección 6 y 7) han dado lugar a numerosos cambios en el panorama del tratamiento del cáncer de próstata avanzado, tanto en la enfermedad hormonosensible, como resistente a la castración ^{70,71}.

La terapia de deprivación androgénica (TDA), bien sea química mediante tratamiento con análogos/antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), o quirúrgica mediante orquiectomía bilateral (actualmente en desuso), es la base del tratamiento sistémico del cáncer de próstata avanzado. En el caso del CPRCm, el esquema de tratamiento con docetaxel/prednisona asociada a TDA fue el primero en demostrar un beneficio en la supervivencia global de estos pacientes en el año 2004 ^{72,73}. Posteriormente, a partir de 2010 se han llevado a cabo varios estudios que han dado lugar a la aprobación de diferentes fármacos para el tratamiento del CPRCm: cabazitaxel (antineoplásico alcaloide inhibidor de los microtúbulos)⁷⁴, abiraterona y enzalutamida (inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos)⁷⁵⁻⁷⁸, radio-223 (radiofármaco emisor de partículas α)⁷⁹ y ¹⁷⁷Lutecio PSMA-617 (radionúclido emisor de partículas β dirigido al PSMA)⁸⁰. Estas nuevas opciones de tratamiento vinieron acompañadas de beneficios en la SG, la SLPr y la calidad de vida de los pacientes, como quedó demostrado en los ensayos clínicos Fase 3 que se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Principales ensayos clínicos Fase 3 en pacientes con CPRCm

Población	Estudio	N	Objetivo primario	SG (meses)				SLPr (meses)			
				Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor	Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor
1ª línea CPRCm	TAX 327 ⁷² Doce/pred vs mitox/pred	1006	SG	19,2	16,3	0,79 (0,67-0,93)	0,004	NR	NR	NR	NR
	SWOG 99-16 ⁷³ Doce/pred vs mitox/pred	770	SG	17,5	15,6	0,80 (0,67-0,97)	0,02	NR	NR	NR	NR
	COU-AA-302 ⁷⁵ Abi/pred vs placebo/pred	1088	SG y SLPr	34,7	30,3	0,81 (0,70-0,93)	0,003	16,5	8,3	0,43 (0,35-0,52)	<0,001
	PREVAIL ⁷⁶ Enzalutamida vs placebo	1717	SG y SLPr	35,3	31,3	0,77 (0,67-0,88)	<0,001	20	5,4	0,32 (0,28-0,36)	<0,001
2ª línea CPRCm (post-doce)	TROPIC ⁷⁴ Cabaz/pred vs mitox/pred	755	SG	15,1	12,7	0,70 (0,59-0,83)	<0,001	NR	NR	NR	NR
	COU-AA-301 ⁷⁷ Abi/pred vs placebo/pred	1195	SG	15,8	11,2	0,74 (0,64-0,86)	<0,001	5,6	3,6	0,66 (0,58-0,76)	<0,001
	AFFIRM ⁷⁸ Enzalutamida vs placebo	1199	SG	18,4	13,6	0,63 (0,53-0,75)	<0,001	8,3	2,9	0,40 (0,35-0,47)	<0,001
	ALSYMPCA ^{*79} Radio-223 vs placebo	921	SG	14,9	11,3	0,70 (0,58-0,83)	<0,001	NR	NR	NR	NR
	VISION ^{*80} ¹⁷⁷ Lu-PSMA-617 vs SOC	831	SG y SLPr	15,3	11,3	0,74 (0,52-0,74)	<0,001	8,7	3,4	0,40 (0,29-0,57)	<0,001

Abreviaturas: SG – Supervivencia Global; SLPr – Supervivencia Libre de Progresión Radiológica; Brazo exp – Brazo experimental; HR – Hazard Ratio; IC – Intervalo de confianza; CPRCm – Cáncer de próstata Resistente a la Castración metastásico; Doce – Docetaxel; Pred – Prednisona; mitox – Mitoxantrona; Abi – Abiraterona; Cabaz – Cabazitaxel; NR – No reportado; SOC – Standard of care.

*En el estudio ALSYMPCA se incluyeron pacientes no candidatos o que rechazaban tratamiento con docetaxel. En el estudio VISION se incluyeron pacientes tras progresión a ≥ 1 inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos y ≥ 1 régimen con taxanos.

El uso de todos estos fármacos se limitó de manera inicial a la fase más tardía de la enfermedad, la resistencia a la castración. Sin embargo, posteriormente algunos de estos agentes (docetaxel, abiraterona y enzalutamida) y otros de nuevo desarrollo (apalutamida y darolutamida: inhibidores de la señalización de andrógenos) han demostrado importantes beneficios en la SG y/o SLPr en etapas más tempranas de la enfermedad, como el CPHSm, que hasta ese momento era tratado únicamente con TDA en monoterapia⁸¹⁻⁹⁰. Múltiples estudios han demostrado el beneficio de combinar a la terapia de privación de andrógenos, o bien quimioterapia (docetaxel)⁸¹⁻⁸³ o bien inhibidores de la señalización de andrógenos (abiraterona, apalutamida o enzalutamida)⁸⁴⁻⁸⁸. De forma más reciente, dos estudios han demostrado también el beneficio de los tripletes^{89,90} (combinaciones de TDA + docetaxel + abiraterona/darolutamida) en este escenario de CPHSm.

Cabe destacar también que varios ensayos clínicos han analizado el papel del tratamiento del tumor primario con radioterapia externa en pacientes con enfermedad metastásica hormonosensible “*de novo*”, demostrando aumento de supervivencia global en aquellos casos con baja carga tumoral, definida en base a los criterios del estudio CHARTED⁸¹ (ausencia de metástasis viscerales y < 4 metástasis óseas)^{91,92}. En la tabla 6 se resumen los principales estudios fase 3 llevados a cabo en población con CPHSm.

Tabla 6: Principales ensayos clínicos Fase 3 en pacientes con cáncer de próstata hormonosensible metastásico.

Población	Estudio	N	Objetivo primario	SG (meses)				SLPr (meses)			
				Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor	Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor
CPHSm	GETUG-AFU 15 ⁸³ Doce/DA vs DA	385	SG	62,1	48,6	0,88 (0,68-1,14)	0,3	22,9	15,3	0,69 (0,55-0,87)	0,002
	CHAARTED ⁸¹ Doce/DA vs ADT	790	SG	57,6	47,2	0,72 (0,59-0,89)	0,001	NR	NR	NR	NR
	STAMPEDE ⁸² Doce/pred/DA vs ADT	1086 †	SG	59,1	43,1	0,81 (0,69-0,95)	0,003	NR	NR	NR	NR
	LATITUDE ⁸⁴ Abi/pred/DA vs plac/plac/DA	1199	SG	53,3	36,5	0,66 (0,56-0,78)	<0,001	33	14,8	0,47 (0,39-0,55)	<0,001
	STAMPEDE ⁸⁵ Abi/pred/DA vs DA	1002 †	SG*	83%	76%	0,61 (0,49-0,51)	<0,001	80%	62%	0,40 (0,34-0,47)	<0,001
	ARCHES ⁸⁷ Enzalut/DA vs placebo/DA	1150	SLPr	NA	NA	0,66 (0,53-0,81)	<0,001	49,8	38,9	0,63 (0,52-0,76)	<0,001
	ENZAMET ⁸⁸ Enzalut/DA vs AA/DA	1125	SG	NA	73,2	0,70 (0,58-0,84)	<0,001	NR	NR	NR	NR

Tabla 6 (continuación): Principales ensayos clínicos Fase 3 en pacientes con cáncer de próstata hormonosensible metastásico.

Población	Estudio	N	Objetivo primario	SG (meses)				SLPr (meses)			
				Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor	Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor
CPHSm	TITAN ⁸⁶ Apalut/DA vs placebo/DA	1052	SG y SLPr [‡]	NA	52,2	0,65 (0,53-0,79)	<0,001	68,2%	47,5%	0,48 (0,39-0,60)	<0,001
	PEACE-1 ⁸⁹ Abi/Doce/DA Vs Doce/DA	710•	SG y SLPr	NA	52,8	0,75 (0,51-0,79)	0,017	24,3	53,5	0,50 (0,34-0,71)	<0,001
	ARASENS ⁹⁰ Daro/Doce/DA Vs Doce/DA	1306	SG	NA	48,9	0,68 (0,57-0,80)	<0,001	NR	NR	NR	NR
	HORRAD ⁹² RDT/DA vs DA	432	SG	45	43	1,11 (0,87-1,43)	0,4	NR	NR	NR	NR
	STAMPEDE ⁹¹ RDT/DA vs DA	2061	SG	48	46	0,92 (0,80-1,06)	0,266	NR	NR	NR	NR

Abreviaturas: SG – Supervivencia Global; SLPr – Supervivencia Libre de Progresión Radiológica; Brazo exp – Brazo experimental; HR – Hazard Ratio; IC – Intervalo de confianza; CPHSm – Cáncer de próstata HormonoSensible metastásico; Doce – Docetaxel; DA – Deprivación Androgénica; Pred – Prednisona; Abi – Abiraterona; AA – Antiandrógeno clásico (bicalutamida, nilutamida, flutamida); Apalut – Apalutamida; RDT – Radioterapia Externa (sobre el tumor primario); NR – No reportado; NA – No alcanzado.

† Sólo pacientes M1

* SG y SLPr expresadas en porcentaje a 3 años

‡ SLPr expresada en porcentaje a 24 meses

§ Pacientes que recibieron docetaxel: ARCHES: 17,8%; ENZAMET: 44%; TITAN: 10,7%; STAMPEDE RT: 18%.

•Población que recibió docetaxel + TDA

El panorama terapéutico del CPRC no metastásico también ha cambiado drásticamente, puesto que hasta hace apenas cinco años era tratado únicamente con maniobras hormonales (retirada/asociación de antiandrógenos clásicos, esteroides, etc),

las cuales no han demostrado impacto en la supervivencia global. Tres grandes ensayos clínicos fase 3 han conducido a la aprobación de diferentes inhibidores de la señalización de andrógenos (apalutamida, darolutamida y enzalutamida) en pacientes con CPRCnm tras demostrar beneficio tanto en SG como en SLM ^{86,93-97} (Tabla 7).

Tabla 7: Principales ensayos clínicos Fase 3 en pacientes con CPRCnm

Población	Estudio	N	Objetivo primario	SG (meses)				SLM (meses)			
				Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor	Brazo exp	Brazo control	HR (IC 95%)	p valor
CPRCnm*	SPARTAN ⁹³ Apalut/DA vs placebo/DA	1207	SLM	73,9	59,9	0,78 (0,64- 0,96)	0,016	40,5	16,2	0,28 (0,23- 0,35)	<0,001
	ARAMIS ⁹⁴ Daro/DA vs placebo/DA	1509	SLM	83%‡	77%‡	0,69 (0,53- 0,88)	0,003	40,4	18,4	0,41 (0,34- 0,50)	<0,001
	PROSPER ⁹⁶ Enzalut/DA vs placebo/DA	1401	SLM	67	56,3	0,73 (0,61- 0,89)	0,001	36,6	14,7	0,29 (0,24- 0,35)	<0,001

Abreviaturas: SG – Supervivencia Global; SLM – Supervivencia libre de metástasis; Brazo exp – Brazo experimental; HR – Hazard Ratio; IC – Intervalo de confianza; CPRCnm – Cáncer de próstata Resistente a la Castración no metastásico; Apalut – Apalutamida; DA – Deprivación Androgénica; Abi – Abiraterona; Daro – Darolutamida; Enzalut – Enzalutamida.

* En los 3 estudios pacientes con CPRCnm de alto riesgo, definidos por tiempo de duplicación de PSA (PSADT) ≤10 meses

‡ SG expresada en porcentaje a 3 años

Uno de los grandes avances en la oncología en general y en el cáncer de próstata en particular es el desarrollo simultáneo de fármacos y biomarcadores de respuesta. En este sentido cabe destacar los diferentes estudios en los cuales los inhibidores de PARP han demostrado beneficio en pacientes portadores de mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN, ⁹⁸ (se describen más ampliamente en la sección 7.4.).

Estos ensayos clínicos han cambiado el enfoque terapéutico del cáncer de próstata, que hasta ahora era tratado como una “única enfermedad”, y han permitido su entrada de lleno en la medicina de precisión. Sin embargo, a pesar de los grandes avances

acontecidos en los últimos años, con la disponibilidad de numerosas opciones de tratamiento, el reto actual radica precisamente en optimizar el manejo de todas las opciones disponibles, con el fin de maximizar el beneficio de los pacientes.

6 Heterogeneidad molecular en cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una enfermedad muy heterogénea, tanto desde el punto de vista clínico como molecular. Comprender esta heterogeneidad por la cual algunos pacientes tienen una enfermedad indolente que tal vez nunca necesite tratamiento, mientras otros presentan evoluciones rápidamente letales, es uno de los mayores retos. Con la aparición y la mejora de nuevas técnicas genómicas de secuenciación, en los últimos años, varios estudios han comenzado a desentrañar parte de esta heterogeneidad y a definir distintos subtipos moleculares ⁹⁹⁻¹⁰³.

Dentro del proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés – *The Cancer Genome Atlas*), en 2015 se presentó un análisis molecular completo de 333 carcinomas de próstata localizados ⁹⁹. Este estudio demostró que el 74% de los tumores podían clasificarse dentro de uno de los siete subtipos definidos por diferentes reordenamientos (*ERG*, *ETV1/4* y *FLII*) o mutaciones en genes específicos (*SPOP*, *FOXA1* e *IDHI*) (Figura 5). Adicionalmente, un 25% de los tumores analizados presentaron alteraciones en vías de señalización potencialmente accionables (como PI3K o MAPK), y en un 19% de ellos se objetivaron defectos en genes relacionados con la reparación del ADN. Sin embargo, es importante destacar que incluso dentro de los diferentes subtipos descritos existe una gran diversidad, y que hasta un 26% de los casos no pudieron ser clasificados dentro de la taxonomía descrita, poniendo de manifiesto la enorme heterogeneidad molecular de esta enfermedad. A pesar del gran avance que supuso esta clasificación taxonómica, hasta el momento no se han establecido claras asociaciones entre los subtipos descritos y el pronóstico de estos pacientes, dificultando por tanto su uso en la práctica clínica.

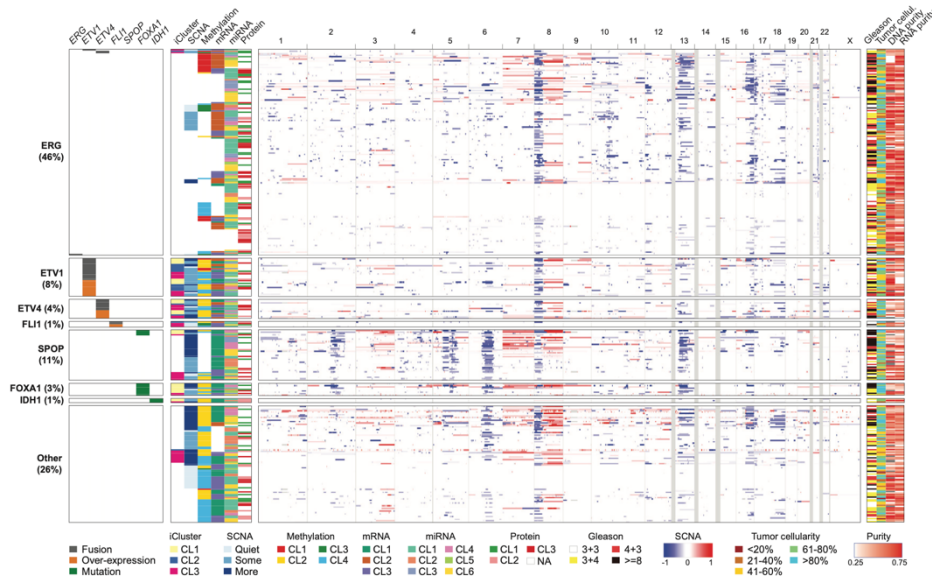


Figura 5: Taxonomía molecular del cáncer de próstata. El análisis molecular de 333 tumores primarios de cáncer de próstata establece 7 subtipos definidos por (de arriba abajo) fusiones ERG (46%), fusiones o sobreexpresión de ETV1/ETV4/FLI1 (8%, 4% y 1%, respectivamente), o mutaciones de SPOP (11%), FOXA1 (3%) e IDH1 (1%). El mapa de calor muestra el número de copias de ADN en cada uno de los casos, mostrando los cromosomas de izquierda a derecha. Las pérdidas de indican con tonos azules y las ganancias en rojo. Procedente de *TCGA, Cell 2015*⁹⁹.

Por otra parte, un análisis comparativo entre muestras de tumores primarios y de pacientes con CPRCm ha puesto de manifiesto distribuciones bastante similares en cuanto a estos subtipos moleculares en ambos escenarios (Figura 6A)^{99,104}. Sin embargo, los tumores resistentes a la castración presentan un mayor porcentaje de alteraciones con respecto a los tumores primarios, como es el caso de las amplificaciones o mutaciones en el receptor de andrógenos (RA), que, aunque son escasas en los tumores primarios, se observan hasta en un 40-70% de los casos con CPRCm, lo cual puede ser el reflejo de la presión selectiva ejercida por el uso de terapias dirigidas frente al RA (aLHRH, abiraterona, enzalutamida, apalutamida, etc). De forma similar, las alteraciones en la vía PI3K (que incluye a *PTEN*), así como las mutaciones o deleciones en genes como *TP53* o *RBI*, entre otros, son mucho más frecuentes en tumores CPRCm (Figura 6B)^{104,105}. Las alteraciones en la vía de reparación del ADN son también más prevalentes en el CPRCm que en tumores localizados^{99,104-106} como se detalla más ampliamente en la sección 7. 2..

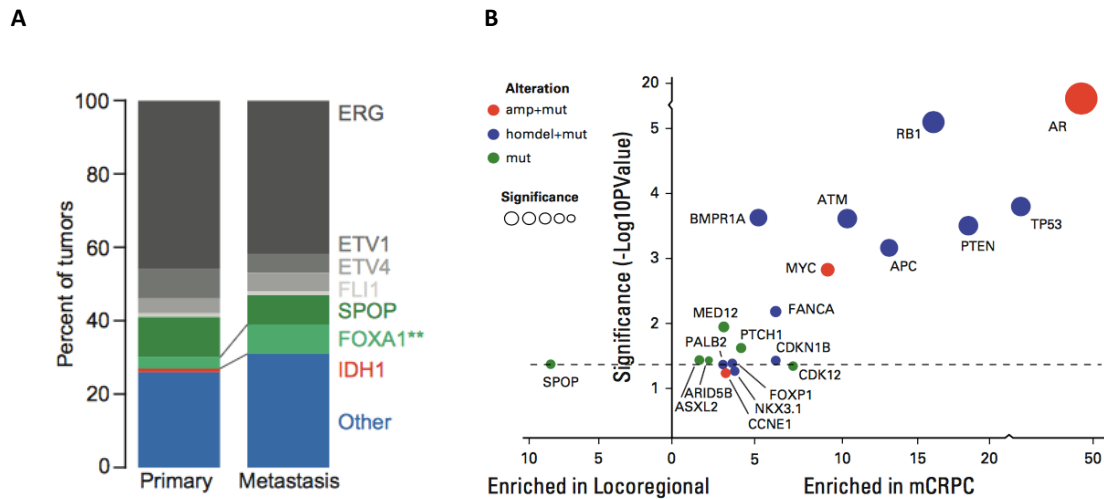


Figura 6: Comparación de las alteraciones genómicas entre cáncer de próstata localizado y metastásico o resistente a castración. (A) La distribución relativa de los diferentes subtipos moleculares (ERG, ETV1/4, FLI1, SPOP, FOXA1, IDH1, otros) es similar entre las muestras de tumores primarios y metastásicos. (B) Enriquecimiento de las alteraciones genómicas de los tumores de pacientes con CPRCm frente a la enfermedad localizada. El nivel de enriquecimiento se representa como la diferencia de frecuencia entre los dos grupos indicados (eje X) y su significación estadística (p valor, eje Y). Cada tipo de alteración se representa en un color diferente. Los diámetros son proporcionales al número de casos con la alteración específica. Procedente de (A) *TCGA, Cell 2015* y (B) *Abida W, JCO Precis Oncol, 2017*¹⁰⁵.

Uno de los mayores avances en la comprensión de la naturaleza molecular del cáncer de próstata vino tras la identificación de una de las alteraciones más prevalentes en esta enfermedad: los reordenamientos que involucran a los factores de transcripción de la familia ETS. Se trata de una fusión en la que el factor de transcripción ETS se trasloca con un elemento regulador que suele ser sensible a los andrógenos^{107–109}. Este reordenamiento está presente en torno al 40-60% de los tumores de próstata¹¹⁰, y la gran mayoría implican la delección o inserción en el cromosoma 21, fusionando el extremo 5' del gen regulado por andrógenos *TMPRSS2* con el factor de transcripción *ERG* de la familia ETS^{107,111}. Otras fusiones descritas involucran a *ETV1* (cromosoma 7), *ETV4* (cromosoma 3) y *FLII* (cromosoma X). Además, aunque el compañero más común de la fusión es el gen *TMPRSS2*, se han identificado más de 10 genes regulados por andrógenos implicados en estos reordenamientos¹¹².

Esta alteración parece ser un evento genómico temprano, que ocurre en tumores localizados e incluso en neoplasias intraepiteliales de alto grado (HGPIN)^{113,114}. Sin embargo, no está claro cuál es el papel pronóstico de este reordenamiento, ya que las

cohortes analizadas son heterogéneas, y los resultados, en ocasiones, contradictorios ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Como se puede observar en la figura 6, dentro del CPRCm, las alteraciones más recurrentes tras las acontecidas en el RA son las que incluyen la pérdida de los genes supresores *TP53*, *RBI* y *PTEN* ^{104,105,118}. *TP53* y *RBI* son genes implicados en el control del ciclo celular. La inactivación de *TP53* por mutaciones o deleciones se produce en alrededor del 40-50% de los tumores de próstata metastásicos, mientras que la pérdida de *RBI* se ha descrito en aproximadamente un 20% de los CPRCm ¹⁰⁴. Alrededor del 4% de los tumores metastásicos tienen una pérdida bialélica conjunta de *TP53* y *RBI* ^{104,119}. Por otra parte, las alteraciones en la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR están presentes en torno al 50% de los CPRCm, siendo la inactivación de *PTEN* el evento más frecuente dentro de esta vía (deleciones descritas en un 40%, siendo menos frecuentes las mutaciones puntuales, en torno a un 5-10% ¹⁰⁰⁻¹⁰³). Cabe destacar que la pérdida de estos tres genes se ha asociado con un comportamiento clínico más agresivo, así como con variantes neuroendocrinas o de célula pequeña ¹²⁰⁻¹²⁵. Las amplificaciones en el cromosoma 8q24, que contiene al oncogén *MYC*, también se han descrito de forma recurrente en cáncer de próstata avanzado ^{101,103,105,126}, relacionándose con mayor agresividad y peor pronóstico ^{127,128}.

7 Vías de reparación del ADN en cáncer de próstata

7.1 Vías de reparación del ADN

En los seres humanos, las células están continuamente expuestas al daño de agentes nocivos externos (por ejemplo, la radiación) e internos (por ejemplo, la formación de radicales libres de nuestro metabolismo). Estos agentes pueden ocasionar más de 10^5 alteraciones en el ADN en cada célula al día, y cada una de esas alteraciones tiene el potencial de modificar el código genético del ADN ¹²⁹. En las células eucariotas, el mantenimiento de la integridad o la estabilidad genómica se consigue mediante elaborados sistemas de vigilancia y mecanismos de reparación del ADN, cada uno de los

cuales se centra en un tipo específico de daño. Estos mecanismos pueden corregir el daño causado, o cuando este no puede ser reparado, iniciar la muerte celular programada ¹³⁰.

La respuesta celular ante un daño en el ADN está mediada por diferentes proteínas que pueden agruparse como sensores (γ H2AX o complejo MRN), transductores (ATM o ATR) o efectores (Chk1 o Chk2) del daño al ADN (Figura 7A). Cuando el daño se limita a una de las cadenas del ADN (rotura de cadena simple, en inglés SSB – *single-strand breaks*), pueden activarse diferentes mecanismos de reparación, entre ellos la reparación por escisión de bases (BER-*base-excision repair*), reparación por escisión de nucleótidos (NER- *Nucleotid-excision repair*) y la reparación por apareamiento erróneo (MMR- *Mismatch repair*). (Figura 7B)

La vía de reparación por escisión de bases (BER) está implicada en la eliminación de modificaciones sutiles del ADN, como los producidos por daños oxidativos, derivados de la alquilación celular y despurinizaciones espontáneas ¹³¹. La base nitrogenada alterada es reconocida, eliminada y reemplazada en un proceso en el que intervienen diferentes enzimas y proteínas. Las proteínas PARP1 y PARP2 están implicadas en la detección de roturas de cadena simple y en la coordinación de la respuesta para reparar este daño.

La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) elimina aquellos daños en el ADN que distorsionan la hélice u otras lesiones más voluminosas causadas por la luz ultravioleta A o la quimioterapia, que forman una amplia categoría de alteraciones que afectan a una de las dos cadenas del ADN ¹³². Es decir, esta vía identifica distorsiones en el ADN y no la secuencia errónea, lo que permite corregir una amplia variedad de daños. Por último, el mecanismo de reparación de errores de apareamiento (MMR) es un sistema de reparación del ADN que reconoce aquellos nucleótidos emparejados de manera incorrecta, así como las inserciones o deleciones que ocasionan la distorsión de la doble hélice ¹³³. Es un mecanismo fundamental para mantener la estabilidad genómica en regiones con secuencias cortas y repetitivas de ADN (conocidas como regiones microsátélites). Los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* son fundamentales en este mecanismo de reparación del ADN (Figura 7B).

Las roturas de la cadena doble (DSBs – *double-strand breaks*) son las lesiones más citotóxicas para el ADN. Los principales mecanismos para reparar estas roturas son la reparación por recombinación homóloga (HRR-*homologous recombination repair*) y la recombinación por extremos no homólogos (NEHJ-*Non-homologous end-joining*). La primera es una vía muy compleja, pero de alta fidelidad, que restaura el código original del ADN sin introducir errores, pero requiere el uso de una cromátida hermana como guía

¹³⁴, y, por lo tanto, está restringida a las fases S y G2 del ciclo celular. Algunos de los componentes clave de esta vía incluyen, entre otros, las proteínas BRCA1, BRCA2, PALB2 y RAD51. La vía de recombinación homóloga participa también en la reparación de los entrecruzamientos intercatenarios, que unen las cadenas de ADN mediante enlaces covalentes y evitan su separación durante la transcripción y la replicación ¹³⁵. En esta vía son importantes las proteínas implicadas en el complejo de la Anemia de Fanconi (FANC). El sistema de recombinación por extremos no homólogos (NEHJ), por el contrario, puede actuar durante todo el ciclo celular y repara las roturas de doble cadena del ADN mediante la religación de los extremos del ADN, sin utilizar una secuencia complementaria u homóloga, por lo que este proceso es propenso a la acumulación de errores, con la posibilidad de introducir nuevas mutaciones ¹³⁶ (Figura 7B). El equilibrio entre ambas vías es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

A pesar de la especificidad de la reparación de los diferentes tipos de lesiones, en algunas ocasiones las vías se superponen o cooperan entre ellas, en particular cuando se trata de lesiones que son más complejas.

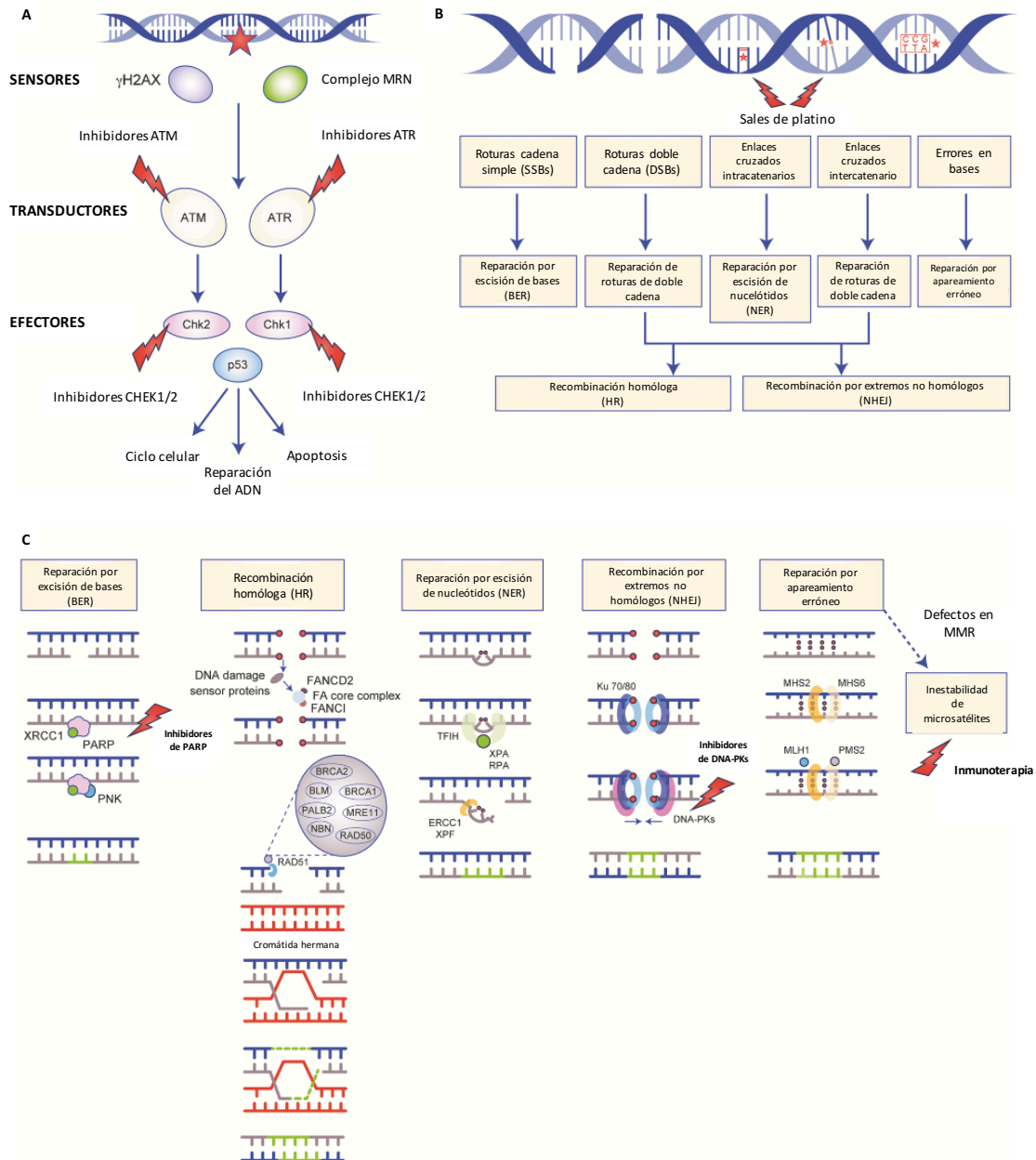


Figura 7: Representación de las diferentes vías de respuesta al daño del ADN. (A) La respuesta al daño del ADN está coordinada por diferentes proteínas cuyas funciones pueden clasificarse de forma simplificada como sensores de daño al ADN, transductores y efectores. El daño en el ADN puede detectarse mediante γ -H2AX y el complejo MRN (sensores), que activan a ATM y ATR. Ambos son transductores clave de las vías de reparación al daño del ADN, que activan a los reguladores del ciclo celular Chk1 y Chk2 (codificados por *CHEK1* y *CHEK2*, respectivamente), que a su vez desencadenan una respuesta que finalmente induce la activación de p53. Este supresor tumoral determina si la célula inicia el ciclo celular, los mecanismos de reparación del ADN o entra en apoptosis, dependiendo del tipo de daño y/o la eficacia de la reparación del ADN. (B) y (C) Los agentes nocivos para el ADN pueden causar diferentes lesiones, cada una de las cuales tiene asociado un mecanismo específico. ATR, ATM y Chk1/2

son quinasas que intervienen en la respuesta a varios tipos de daño al ADN. Por lo tanto, la inhibición de estas quinasas puede ser eficaz en ciertos tumores con alteraciones en genes implicados en la reparación del ADN o puede servir para aumentar la actividad de otros agentes que causan daños en el ADN (las sales de platino). De forma análoga, el complejo de DNA-PKs es una quinasa implicada en la vía de NEJH, cuya inhibición mediante fármacos dirigidos también se está testando en múltiples tumores, incluido el cáncer de próstata. Las sales de platino (cisplatino o carboplatino) inducen la aparición de enlaces cruzados de ADN inter e intracatenarios. Estas alteraciones requieren la acción coordinada de las vías de RH, NEJH y reparación por escisión de nucleótidos (NER) para ser reparadas. Cuando se altera la función en alguno de los genes que intervienen en alguna de estas vías (bien sea en la línea somática o germinal), el efecto citotóxico de la quimioterapia basada en sales de platino no puede repararse, lo que provoca la muerte celular (apoptosis). Los inhibidores de PARP interactúan con PARP, inhibiendo su función. Esto da lugar a la acumulación de roturas de cadena simple, lo que a su vez conduce a la formación de roturas de cadena doble. Las células “normales” tiene la capacidad de reparar las roturas de doble cadena, sin embargo, no pueden hacerlo en presencia de alteraciones en la función de los genes implicados en la vía de RH (*BRCA1/2*, familia anemia de Fanconi [FA]), proceso conocido como letalidad sintética. La deficiencia de alguno de los genes implicados en MMR conduce a la acumulación de mutaciones somáticas, y por lo tanto, aumenta la presencia de neoantígenos. La presencia de niveles elevados de neoantígenos se ha correlacionado con una mejor respuesta a inmunoterapia. Figura modificada de *Lozano R, Br J Cancer, 2021*.

7.2 Prevalencia de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata

Durante los últimos años, diferentes estudios han puesto de manifiesto la alta prevalencia de las alteraciones en genes implicados en la reparación del ADN en cáncer de próstata^{99,104–106,118,121}. En 2015, el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés – *The Cancer Genome Atlas*) publicó el análisis molecular de 333 tumores primarios de próstata con estadio localizado, revelando que hasta un 19% de los mismos albergaban alteraciones en diferentes genes relacionados con la reparación del ADN, como *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *CDK12*, *FANCD2* o *RAD51C*, entre otros⁹⁹. *BRCA2* fue el gen más frecuentemente alterado, pero cabe señalar que los 6 casos con mutaciones en la línea germinal presentaban la misma variante, p.K3326*, cuya significación patogénica no está claramente dilucidada. Al mismo tiempo, un estudio del *International Stand Up*

to Cancer/Prostate Cancer Foundation Team (SU2C/PCF) identificó alteraciones genómicas afectando a genes de la reparación del ADN en el 23% de las 150 muestras analizadas, en este caso biopsias de metástasis. Un 13% de los casos tenían alteraciones en *BRCA2*, seguido de un 7,3% en *ATM*, un 2% en *MSH2* y un 0,3% en *BRCA1*, *FANCA*, *MLH1*, *RAD51B* y *RAD51C*¹⁰⁴. Una serie más amplia (n=1.013), que incluía muestras de los estudios previamente mencionados, identificó la presencia de defectos en genes de la reparación del ADN en el 10% y el 27% de las biopsias de tumores primarios y metastásicos, respectivamente¹¹⁸. Este hallazgo es concordante con la observación de que este tipo de alteraciones se asocian con grados histológicos más altos y estadios más avanzados¹³⁷⁻¹⁴⁰. Hay que tener en cuenta que la prevalencia de las alteraciones en estos genes implicados en la reparación del ADN puede variar de unos estudios a otros en función del número de genes analizados, la técnica empleada y las características histopatológicas de los tumores incluidos. La serie más amplia de muestras de cáncer de próstata en la que se ha analizado la presencia de defectos en genes de la reparación del ADN ha sido proporcionada recientemente por el estudio PROfound, un ensayo clínico Fase 3 en el cual se ha demostrado el beneficio de olaparib, un inhibidor de PARP, en CPRCm¹⁴¹. En este estudio se han examinado de manera satisfactoria 2.792 biopsias con el fin de detectar alteraciones en 15 genes relacionados con la recombinación homóloga. Estos defectos se observaron en un 28% de las muestras analizadas¹⁴², con una frecuencia similar en las biopsias procedentes del tumor primario (27%) y en las procedentes de metástasis (32%), lo que sugiere que las alteraciones en genes de la RH son acontecimientos tempranos en la evolución de los tumores más agresivos de cáncer de próstata. *BRCA2* (8,7%), *CDK12* (6,3%), *ATM* (5,9%), *CHEK2* (1,2%) y *BRCA1* (1%) fueron los genes alterados con mayor frecuencia. Hasta en un 2,2% de los casos se encontraron alteraciones simultáneas en dos o más de los genes analizados, aunque por el momento no están claras las repercusiones que puede implicar este hecho. Por otra parte, la prevalencia de defectos en genes relacionados con la reparación por apareamiento erróneo (MMR) en cáncer de próstata ha quedado establecida en una serie de más de 1.000 pacientes, publicada por Abida et al¹⁴³. En este estudio, se observó que el 3,1% de los casos presentaban una deficiencia en alguno de los genes analizados, siendo *MSH2* el más frecuente (Tabla 8).

Tabla 8: Prevalencia de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en enfermedad localizada y avanzada

Gen	Enfermedad localizada ^{99,143}	Enfermedad avanzada ^{104-106,143,144}
<i>BRCA2</i>	3%	13.3%
<i>BRCA1</i>	1%	1.9%
<i>ATM</i>	4%	7.3%
<i>CHEK2</i>	0%	1.9%
<i>CDK12</i>	2%	6.9%
<i>PALB2</i>	--	0.4%
<i>RAD51C</i>	3%	0.14%
<i>RAD51D</i>	0%	0.4%
<i>FANCD2</i>	6%	0.7%
<i>MLH1</i> *	0.6%	1.3%
<i>MSH2</i> *	1.2%	2.7%
<i>MSH6</i> *	1.4%	2%

*La frecuencia de MMR en una publicación que incluyó tanto pacientes con enfermedad localizada como avanzada¹⁴³ fue del 3,1%

Uno de los aspectos más notables del estudio presentado por el SU2C-PCF fue que casi la mitad de las alteraciones identificadas (8%) en los pacientes con CPRCm estaban presentes en la línea germinal¹⁰⁴. Este estudio fue el primero en sugerir que las variantes germinales en estos genes, asociadas a un mayor riesgo de desarrollar cáncer, estaban presentes con una prevalencia superior a la previamente documentada en pacientes con cáncer de próstata metastásico. Posteriormente, estos hallazgos se confirmaron en un estudio retrospectivo y multicéntrico, con datos de 692 pacientes con cáncer de próstata avanzado (incluyendo datos del estudio del SU2C-PCF). En este análisis, el 11,8% de los pacientes se identificaron como portadores de mutaciones en la línea germinal en al menos uno de los 20 genes analizados, todos ellos relacionados con la reparación del ADN¹⁰⁶. En esta serie, el gen alterado con mayor frecuencia fue *BRCA2*, con un 5,3%, seguido de *CHEK2* (2%), *ATM* (1,6%) y *BRCA1* (0,1%). Las mutaciones en el resto de los genes analizados representaron menos del 0,5% de los casos.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios mencionados en los cuales se ha analizado la presencia de defectos en genes de la reparación del ADN, no distinguen entre

el origen somático o germinal de los mismos. De manera reciente se han presentado datos de un análisis de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* en más de 17.000 tumores, entre los cuales se incluyeron 1.042 cánceres de próstata (92 de ellos presentaron alteraciones en *BRCA2*). A diferencia de los demás tipos de cáncer incluidos, en los tumores de próstata, la proporción de mutaciones en la línea germinal y somática en *BRCA2* fue similar. En este estudio, además, los tumores de próstata se describen como el único tumor asociado a mutaciones en *BRCA2* (entre los cuales se encuentran también el cáncer de ovario, el de mama y el de páncreas) con una tasa similar de alteraciones bialélicas (70%) tanto en línea somática como germinal ¹⁴⁵. Por el contrario, la proporción entre mutaciones somáticas/germinales en genes MMR en cáncer de próstata es menor, ya que en el estudio de Abida et al ¹⁴³ menos de la cuarta parte (22%) de los tumores con defectos en estos genes albergaban mutaciones en la línea germinal. Esto está en consonancia con estudios anteriores en los que se demostró que las mutaciones germinales eran mucho menos frecuentes en cáncer de próstata que en otros tipos de tumores con defectos en genes MMR, como los colorectales o uroteliales ¹⁴⁶.

De forma reciente, el análisis más amplio realizado con datos de secuenciación emparejada de tejido tumoral y tejido normal en 49.264 tumores ha establecido una serie de recomendaciones sobre los genes en los que debería realizarse un análisis germinal, entre los que se encuentran *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PALB2*, entre otros¹⁴⁷. Dentro del estudio se incluyeron 2.843 muestras tumorales de cáncer de próstata, en las cuales se observó que la proporción de variantes patogénicas de origen germinal detectadas en tejido tumoral frente a origen somático era superior en comparación con otros tumores como el cáncer de mama u ovario (Figura 8).

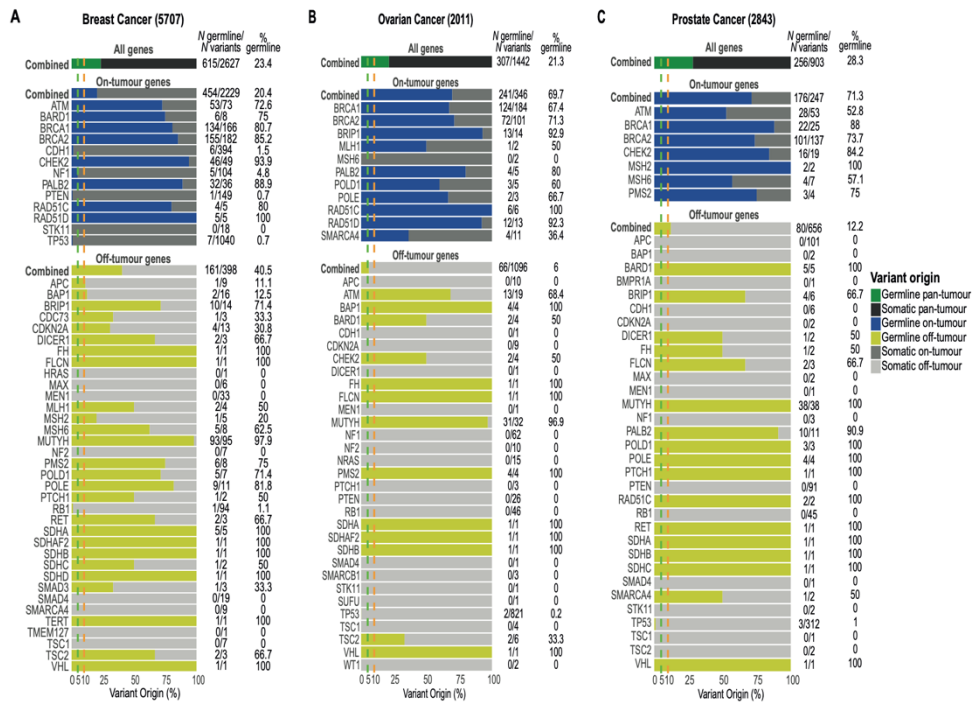


Figura 8: Proporción de variantes patogénicas de origen germinal en comparación con origen somático detectadas en tejido tumoral en cáncer de mama, ovario y próstata. Gráficos de barras que muestran la proporción de variantes patogénicas detectadas en tejido tumoral que son de origen germinal (barras verdes para *pan-tumor*, barras azules para *on-tumor* y barras amarillas para *off-tumor*) frente a las de origen somático (barras negras para *pan-tumor*, barras grises oscuro para *on-tumor* y barras grises claro para *off-tumor*) en las muestras del estudio que comprenden 45.472 tumores no hipermutados en 47 tipos de cáncer. Los datos se muestran por grupos de asociación génica y por gen, para 48, 42 y 39 genes de susceptibilidad al cáncer accionables para (A) cáncer de mama, (B) cáncer de ovario y (C) cáncer de próstata, respectivamente. La columna adyacente proporciona los recuentos de variantes y las proporciones en la línea germinal. *Pan-tumor* significa todos los tipos de tumores combinados; *on-tumor* incluye solo los tipos de tumores en los que el gen está asociado, *off-tumor* incluye solo los tipos de tumor en los que el gen no está asociado. Figura extraída de Kuzbari Z, *Ann Oncol*, 2023.

7.3 Implicaciones clínicas de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata

Debido a la alta prevalencia de mutaciones en la línea germinal en estos genes, diferentes guías clínicas recomiendan realizar el cribado de las mismas en todos los pacientes con cáncer de próstata localizado de alto riesgo y en aquellos con enfermedad metastásica ^{41,47,148,149}. Además, la reciente aprobación de varios inhibidores de PARP para el tratamiento del CPRCm ha hecho aún más relevante la realización de este tipo de pruebas en este entorno. Por lo tanto, es probable que el número de pacientes con cáncer de próstata con defectos en genes relacionados con la reparación del ADN se vea aumentado en un futuro próximo. Sin embargo, las posibles implicaciones clínicas que tienen estas alteraciones en estos pacientes no están del todo claras en la actualidad, con excepción de las mutaciones germinales *BRCA2*, que han demostrado ser un factor pronóstico independiente en diferentes estudios ^{137,150,151}, como se detalla a continuación.

7.3.1 Cáncer de próstata localizado

Las opciones de tratamiento en este entorno son diversas, incluyendo la vigilancia activa, la prostatectomía radical y/o la radioterapia con o sin deprivación androgénica. Los datos relativos a las implicaciones clínicas de los defectos en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata con estadio localizado provienen de análisis retrospectivos, la mayoría de ellos centrados en mutaciones *BRCA1/2* en línea germinal.

Un estudio en 1.211 pacientes sometidos a vigilancia activa, en el cual se incluyeron 11 portadores de mutaciones germinales *BRCA1*, 11 *BRCA2* y 5 *ATM*, demostró que los *gBRCA2* tenían más probabilidades de sufrir una reclasificación hacia un grado de Gleason más alto en biopsias sucesivas. En esta serie, la incidencia de esta reclasificación hacia un grado histológico superior a los 2, 5 y 10 años fue del 27%, 50% y 78%, respectivamente en los *gBRCA2* en comparación con el 10%, 22% y 40% en los no portadores ($p=0,001$) ¹⁵¹. Estos hallazgos sugieren que la vigilancia activa no sea quizá el tratamiento más adecuado para los pacientes *gBRCA2* con tumores de bajo riesgo (clasificación D'Amico).

Por otra parte, no se dispone de datos concluyentes sobre el posible papel de las alteraciones en *BRCA2* u otros genes relacionados con la reparación del ADN a la hora de seleccionar entre las diferentes opciones de tratamiento curativo (prostatectomía radical o radioterapia). Los únicos datos proceden de un estudio retrospectivo en el que se analizaron 1.302 pacientes (18 *gBRCA1* y 49 *gBRCA2*) con enfermedad localizada. En esta serie, los *gBRCA1/2*, tras el tratamiento radical, desarrollaron metástasis significativamente antes que los no portadores. En los pacientes tratados con cirugía, la tasa de supervivencia libre de metástasis a los 5 y 10 años fue del 89% y el 67% en los *gBRCA1/2*, en comparación con el 97% y el 91% en los no portadores ($p=0,024$). Esta diferencia fue aún mayor para los pacientes tratados con radioterapia, ya que solamente el 57% y el 39% de los *gBRCA1/2* estaban libres de metástasis a los 5 y 10 años, respectivamente, en comparación con el 91% y el 80% de los no portadores ($p<0,001$)¹⁵⁰. Sin embargo, no es posible realizar una comparación directa entre ambos grupos, ya que los pacientes tratados con radioterapia (tanto portadores como no portadores) presentaban una enfermedad más avanzada que los tratados mediante prostatectomía radical. Por lo tanto, no es posible concluir en base a este estudio cuál de las dos opciones de tratamiento podría ser mejor en los pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA1/2*.

7.3.2 Cáncer de próstata metastásico hormonosensible y resistente a la castración

Las implicaciones clínicas de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata avanzado son confusas, ya que la información disponible es, en cierta medida contradictoria.

En el caso del cáncer de próstata metastásico hormono-sensible (CPHSm), un estudio llevado a cabo en pacientes con CPRCm ha proporcionado datos retrospectivos sobre el tiempo a la resistencia a castración (TRC) desde el inicio de DA¹⁵². En este análisis se observó que los pacientes con mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN presentaban un TRC significativamente más corto que los no portadores (11,8 vs 19,0 meses, $p=0,031$). De forma reciente, otro análisis de un registro prospectivo en 704 pacientes con cáncer de próstata avanzado ha demostrado diferencias en el TRC entre portadores y no portadores (23,1 vs 32,5 meses, respectivamente), pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0,96$)¹⁵³. Los únicos datos prospectivos en este escenario provienen de un estudio publicado por Vandekerkhove et al¹⁵⁴. Se incluyeron 53

pacientes con CPHSm *de novo*, objetivándose un TCR significativamente más corto en los 11 casos con alteraciones somáticas y/o germinales en genes de la reparación del ADN en comparación con aquellos pacientes que no presentaban dichas alteraciones (7,3 meses vs mediana no alcanzada, $p=0,01$). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa en el análisis multivariable ¹⁵⁴. Hay que tener en cuenta que estos estudios se han llevado a cabo en pacientes en los cuales el tratamiento para el CPHSm era exclusivamente la TDA, por lo que no pueden extrapolarse al escenario terapéutico actual, en el cual diferentes combinaciones de TDA con quimioterapia o agentes hormonales son el tratamiento de elección.

En cuanto al CRPCm, tres estudios retrospectivos han evaluado el papel de las mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN en pacientes tratados con ARSi y taxanos. En el primero de ellos, Annala et al ¹⁵⁵ incluyeron 176 pacientes con CPRCm, 22 de los cuales eran portadores de mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN (16 *gBRCA2*). Se demostró que los portadores que recibían un ARSi como tratamiento de primera línea tenían una SLP más corta que los no portadores (3,3 vs 6,2 meses, $p=0,01$), notificando, sin embargo, respuestas muy prolongadas a los ARSi en algunos portadores. Es importante señalar que casi todos los pacientes con mutaciones germinales en esta serie tenían una fracción de ADN tumoral circulante (ADNtc) de $>30\%$, hecho que se ha correlacionado con una mayor carga tumoral y peor SG ¹⁵². Por consiguiente, se podría cuestionar si el mal pronóstico reportado en esta serie de pacientes viene dado solamente por la presencia de mutaciones germinales o también por otros factores de confusión, como la alta carga tumoral o valores de ADNtc elevados. En otro de los estudios, Antonarakis et al analizaron un total de 172 pacientes con CPRCm, incluyendo 22 portadores germinales (5 *gBRCA2*) que fueron tratados con ARSi ¹⁵⁶. En este análisis, los portadores mostraron una tendencia no significativa a presentar una SLP más corta que los no portadores (15 vs 10,8 meses, $p=0,090$). Curiosamente, los pacientes que recibieron quimioterapia antes del ARSi tuvieron una SLP y una SCE aún más cortas, lo que sugiere que la secuencia de tratamiento podría ser importante en este contexto. En el último de los estudios se incluyeron 390 pacientes con CPRCm ¹⁵⁷, procedentes de la serie previamente publicada por Pritchard et al ¹⁰⁶ en la que se describía la prevalencia de las alteraciones en genes de la reparación del ADN. Este estudio contaba con 60 pacientes portadores de mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN (37 *gBRCA2*). No se observaron diferencias significativas entre portadores y no portadores en las

respuestas a ARSis o taxanos, ni tampoco en la SG. Sin embargo, a diferencia de los estudios previos, hasta un 47% de los pacientes portadores de esta serie habían recibido sales de platino y/o inhibidores de PARP, lo cual pudo suponer un efecto de confusión en los resultados obtenidos.

Durante los últimos años también se han comunicado datos sobre las implicaciones clínicas de las alteraciones en *CDK12* y en genes MMR en cáncer de próstata. La prevalencia de mutaciones en *CDK12* se ha reportado en torno a un 6% en pacientes con CPRCm ¹⁴¹, las cuales con relativa frecuencia son bialélicas ^{144,158}. Este gen está implicado en el proceso de recombinación homóloga, pero también es clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica, de manera que su inactivación define un subgrupo de tumores de próstata caracterizados por una marcada inestabilidad genómica, con la presencia de duplicaciones en tándem, mayores niveles de infiltración de linfocitos T y neoantígenos ^{144,158}. Cuatro series de pacientes retrospectivas han puesto de manifiesto la agresividad de los tumores de próstata portadores de alteraciones en *CDK12*, los cuales presentan grupos pronósticos de Gleason 4 o 5 y metástasis al diagnóstico en un alto porcentaje de los casos. Además, estos pacientes presentaban TRC más cortos y escasas respuestas a abiraterona o enzalutamida ^{138-140,159}. Cabe destacar que uno de estos estudios ha sugerido que las alteraciones en *CDK12* pueden conllevar un peor pronóstico incluso que otras alteraciones somáticas en *BRCA1/2*, *ATM* o *TP53* ¹³⁸. Las alteraciones en genes MMR también se han asociado a características clínico-patológicas más agresivas y presencia de enfermedad más avanzada al diagnóstico ^{40,160}. Sin embargo, sus implicaciones clínicas no parecen claras; un estudio ha sugerido que estos pacientes tienen respuestas muy favorables a la TDA ⁴⁰, mientras que otros han arrojado resultados contradictorios, demostrando TRC más cortos ^{160,161}. Estas diferencias pueden ser debidas al escaso número de pacientes analizados, o también a los diferentes métodos empleados para detectar estas alteraciones (paneles de secuenciación vs inmunohistoquímica). Es necesario llevar a cabo más estudios para dilucidar completamente cuales son las repercusiones clínicas de estas y otras alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en cáncer de próstata.

7.4 Alteraciones en genes de la reparación del ADN como diana terapéutica

La alta prevalencia de las alteraciones en estos genes en pacientes con cáncer de próstata avanzado ofrece una oportunidad única para aprovechar estos defectos como diana terapéutica.

7.4.1 Quimioterapia basada en sales de platino

Los platinos son agentes citotóxicos alquilantes que causan enlaces cruzados en las cadenas del ADN, que no pueden ser fácilmente reparados cuando la vía de la recombinación homóloga está dañada, lo que conduce a la muerte celular (Figura 7). Esta estrategia ha demostrado su beneficio en el tratamiento de tumores de mama ^{162,163} y de ovario ¹⁶⁴ con mutaciones patogénicas en *BRCA1* o *BRCA2*. Aunque las sales de platino no son una opción de tratamiento estándar en pacientes con cáncer de próstata, estas han demostrado su beneficio en casos con diferenciación neuroendocrina ^{165,166}. En presencia de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN, varios estudios retrospectivos han sugerido que los pacientes con cáncer de próstata con mutaciones en *BRCA2* podrían beneficiarse de esta estrategia terapéutica ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. El mayor de estos análisis incluyó 141 pacientes con CPRCm tratados con carboplatino y docetaxel, reportando un beneficio con esta combinación en aquellos portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* ¹⁶⁸. Las respuestas por PSA $\geq 50\%$ a las 12 semanas fueron superiores en los portadores *gBRCA2* que en los no portadores (75% vs 17%, $p=0,001$), observándose también una mayor supervivencia en los *gBRCA2* en comparación con los no portadores (18,9 vs 9,5 meses). Un segundo estudio también evaluó la eficacia de los platinos en 109 pacientes con CPRCm ¹⁷⁰, demostrando que las respuestas por PSA $\geq 50\%$ fueron más frecuentes en los pacientes con alteraciones en genes de la reparación del ADN que en los no portadores (50% vs 13%, $p=0,006$). Este análisis, además, incluyó un subconjunto de pacientes con defectos en la reparación del ADN, que recibieron el tratamiento con platino tras haber progresado a un inhibidor de PARP ($n=8$), observándose un beneficio clínico en un tercio de ellos. Cabe destacar que ninguno de los pacientes con mutaciones en *ATM* respondió al platino, independientemente del tratamiento previo con iPARP. Actualmente se están llevando a cabo estudios para validar

estos resultados y establecer el posible papel de la quimioterapia con platino en pacientes con cáncer de próstata en diferentes escenarios.

7.4.2 Inhibidores de PARP y letalidad sintética

Otra de las estrategias para tratar los tumores con defectos en los genes de la reparación del ADN es explotar la letalidad sintética que surge de la interacción entre la inhibición de PARP y el deterioro de la vía de RH ya presente en algunos tumores. Varios iPARP, que difieren en su capacidad para unirse a PARP ¹⁷¹ se encuentran en diferentes etapas de desarrollo.

7.4.2.1. TOPARP-A y TOPARP-B

En el ensayo clínico Fase 2 TOPARP-A ¹⁷², 50 pacientes con CPRCm previamente politratados recibieron olaparib. Catorce de los 16 pacientes (88%) que presentaban defectos en la reparación del ADN (somáticos o germinales) presentaron un beneficio clínico (definido por la presencia de respuestas radiológicas, respuestas por PSA y/o disminución en el recuento de células tumorales circulantes), con respuestas duraderas en el tiempo. Los 7 pacientes portadores de mutaciones en *BRCA2* respondieron, pero también algunos con alteraciones en *BRCA1*, *ATM* y *PALB2*. Posteriormente, el ensayo Fase 2 TOPARP-B ¹⁷³, reclutó a 98 pacientes con CPRCm con alteraciones en genes de la reparación del ADN. La mitad de ellos recibió una dosis de 300 mg dos veces al día, y la otra mitad 400 mg dos veces al día. Se observaron respuestas radiológicas y por PSA en el 39% y el 16% de los pacientes asignados a la cohorte de 300 mg y en el 54% y el 24% en la de 400 mg, respectivamente. A pesar de un mayor porcentaje de respuestas en el brazo de 400 mg, en el 37% de estos pacientes se tuvo que reducir la dosis a 300 mg debido a la toxicidad. En este estudio se incluyeron 30 pacientes con mutaciones *BRCA1/2*, de los cuales, el 52% y el 77% presentaron respuestas radiológicas o por PSA, respectivamente, en comparación con el 5% y el 11% de los portadores de alteraciones en otros genes de la reparación.

7.4.2.2. PROFOUND

El estudio PROfound¹⁴¹ es un ensayo clínico Fase 3 en el que pacientes con CPRCm portadores de alteraciones en genes de la reparación del ADN, tras progresión a ARSi, fueron asignados con una proporción 2:1 a recibir olaparib vs el ARSi alternativo. Los pacientes con alteraciones en genes de la RH fueron estratificados en 2 cohortes: cohorte A (*BRCA1*, *BRCA2* y *ATM*), y cohorte B (*BARD1*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* y *RAD54L*). El estudio alcanzó su objetivo primario, puesto que demostró un beneficio estadísticamente significativo en la SLP radiológica (SLPr) en los pacientes de la cohorte A, con una mediana de 7,4 meses en pacientes tratados con olaparib vs 3,5 meses en los que recibieron abiraterona o enzalutamida ($p < 0,001$; HR 0,34; IC 95% 0,25-0,47). En un análisis exploratorio para evaluar la actividad gen por gen, se observó que los pacientes con alteraciones en *BRCA2* fueron los que obtuvieron un mayor beneficio con olaparib. El análisis final sobre la supervivencia global ha sido reportado posteriormente¹⁷⁴, mostrando un claro beneficio en los pacientes con mutaciones *BRCA1*, *BRCA2* y *ATM* (cohorte A), con una mediana de 19,1 meses en el brazo de olaparib en comparación con 14,7 meses con ARSi (HR 0,69, $p = 0,02$), a pesar de que el 66% de los pacientes en el brazo control se cruzaron al brazo de olaparib tras la progresión radiológica. En la cohorte B la diferencia no fue estadísticamente significativa (14,1 vs 11,5 meses para olaparib vs brazo control, respectivamente; HR 0,96; IC95% 0,63-1,49). La mediana de SG en la población global del estudio (cohorte A y B) fue de 17,3 vs 14,0 meses (HR 0,79) con olaparib y tratamiento hormonal, respectivamente. Tras estos resultados, la EMA (*European Medicines Agency*) ha aprobado el tratamiento con olaparib para pacientes con CPRCm portadores de mutaciones en *BRCA1/2*, tras progresión a un ARSi.

Aunque los resultados de este estudio fueron muy importantes, al mismo tiempo, planteaban una serie de cuestiones: en primer lugar, el mayor beneficio de olaparib se observó en los pacientes portadores de alteraciones en *BRCA2*. Sin embargo, el posible beneficio de los iPARP en pacientes portadores de alteraciones en *ATM* era más dudoso. Por otra parte, el tratamiento del brazo control del estudio PROfound podría considerarse subóptimo: un inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos tras progresión a otro inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos, secuencia de tratamiento que ha demostrado ser escasamente eficaz en diferentes estudios^{175,176}. Por ello, se planteaba la duda de los resultados del estudio si el brazo control hubiera sido un

tratamiento más activo, como un taxano. En el PROfound, aunque no era obligatorio que los pacientes hubieran recibido previamente docetaxel, aproximadamente el 65% de los pacientes lo habían recibido. Un subanálisis puso de manifiesto, además, que el mayor beneficio se obtenía en pacientes que recibían olaparib antes de docetaxel, lo cual nos llevaba a plantearnos si olaparib debía emplearse antes o después de quimioterapia. Todas estas cuestiones se han resuelto de forma reciente a través del estudio TRITON3¹⁷⁷.

7.4.2.3. TRITON2 y TRITON3

El TRITON2 es un ensayo clínico Fase 2 que ha evaluado la eficacia de rucaparib en pacientes con CPRCm previamente politratados ¹⁷⁸. Se incluyeron pacientes con alteraciones en *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK2*, *FANCA*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* o *RAD54L* detectadas en tejido tumoral, o también alteraciones en *ATM*, *BRCA1* y *BRCA2* detectadas en plasma. El 43,5% de los pacientes con alteraciones en *BRCA1/2* y enfermedad medible presentaron respuestas radiológicas, que en el 60% de los casos, además, se prolongaron más de 6 meses. También se documentaron respuestas por PSA (descenso $\geq 50\%$) en el 52% de los pacientes *BRCA1/2*. No se observaron diferencias en la respuesta entre sujetos con alteraciones somáticas o germinales en *BRCA2* ¹⁷⁸.

De forma más reciente, se han publicado los resultados del TRITON3, un ensayo clínico Fase 3, en el cual pacientes con CPRCm portadores de alteraciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *ATM*, tras progresión a un ARSi se randomizaban 2:1 a recibir rucaparib frente a la elección del investigador (docetaxel o un segundo ARSi). La distribución entre ambos tratamientos del brazo control fue muy similar (55% docetaxel vs 45% ARSi). Es el primer estudio que ha enfrentado a un inhibidor de PARP con un taxano. Rucaparib ha demostrado beneficio en la supervivencia libre de progresión radiológica (11,2 meses) frente al brazo control (6,4 meses) con una HR de 0,50 (IC95% 0,36-0,69; $p < 0,001$) en la población *BRCA1/2* y en la población global (*BRCA + ATM*) (10,2 vs 6,4 meses, HR 0,61; IC95% 0,47-0,80; $p < 0,001$). Sin embargo, en el subgrupo de pacientes *ATM* no se observaron diferencias significativas entre rucaparib y el brazo control (8,1 vs 6,8 meses; HR 0,95; IC95% 0,59-1,52). Este estudio, por tanto, es el primero que ha enfrentado a un inhibidor de PARP con un taxano, confirmando el beneficio significativo de rucaparib en pacientes portadores de alteraciones en *BRCA1/BRCA2*, pero no en los *ATM*.

7.4.2.4. GALAHAD

También se han comunicado los resultados de otro ensayo clínico Fase 2 que evalúa la eficacia de niraparib en pacientes con CPRCm previamente politratados ¹⁷⁹. Se incluyeron pacientes con alteraciones bialélicas en *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *FANCA*, *HDAC2* o *PALB2* detectadas en ADN circulante. La tasa global de respuesta para pacientes con alteraciones bialélicas en *BRCA1/2* fue del 34,2%, con una mediana de duración de 5,5 meses; y la tasa de respuestas por PSA fue del 50% ¹⁷⁹. Al contrario que otros estudios, en el GALAHAD sólo eran elegibles pacientes con alteraciones bialélicas, sin embargo, a la vista de las tasas de respuesta reportadas, no está claro que los pacientes con alteraciones bialélicas puedan responder mejor a los iPARP, al menos en pacientes con CPRCm. Estos hallazgos están en consonancia con un estudio publicado de manera reciente por Jonsson et al ¹⁴⁵, en el cual se demostró que el beneficio clínico de los iPARP en los tumores asociados a mutaciones *BRCA2*, como son el cáncer de próstata, de mama, de ovario y de páncreas, era similar independientemente de que las alteraciones fueran somáticas, germinales, mono- o bialélicas.

Tabla 8: Características de los principales estudios con inhibidores de PARP en monoterapia en CPRCm

	PROFOUND ¹⁴¹	TRITON3 ¹⁷⁷	TALAPRO 1 ¹⁸⁰	GALAHAD ¹⁷⁹
Tratamiento	Olaparib 300mg 2 veces/24h	Rucaparib 600mg 2 veces/24h	Talazoparib 1mg /24h	Niraparib 300mg /24h
Diseño del estudio	Fase III	Fase III	Fase II	Fase III
Población	CPRCm Progresión a ARSi	CPRCm Progresión a ARSi	CPRCm Progresión a ARSi y taxano	CPRCm Progresión a ARSi y taxano
Pacientes incluidos	N=387	N=410	N=104	N=289
Objetivo primario	SLPr en pacientes con alteraciones en <i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> (Cohorte A)	SLPr en pacientes con alteraciones <i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	TGR en pacientes con alteraciones DDR	TGR en pacientes con alteraciones bialélicas en <i>BRCA1/2</i>
Tipo de material analizado	Tejido tumoral Central	Plasma o tejido tumoral Central/Local	Tejido tumoral Central/Local	Plasma Central
Test	FoundationOne®	FoundationOne®	FoundationOne®	Resolution-HRD®
Genes analizados	<i>ATM</i> , <i>BARD1</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIPI1</i> , <i>CDK12</i> , <i>CHEK1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>FANCL</i> , <i>PALB2</i> , <i>PPP2R2A</i> , <i>RAD51B</i> , <i>RAD51C</i> , <i>RAD51D</i> , <i>RAD54L</i>	<i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	<i>ATM</i> , <i>ATR</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>FANCA</i> , <i>MLH1</i> , <i>MRE11A</i> , <i>NBN</i> , <i>PALB2</i> , <i>RAD51C</i> ,	<i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIPI1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>FANCA</i> , <i>HDAC2</i> , <i>PALB2</i>
Tipo de alteración requerida	Alteraciones mono- y bialélicas			Alteraciones bialélicas

Abreviaturas: CPRCm – Cáncer de próstata resistente a la castración metastásico; ARSi – Inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos; SLPr – Supervivencia libre de progresión radiológica; TGR – Tasa global de respuesta; DDR – Genes relacionados con la reparación del ADN.

Aunque el beneficio de los iPARP en pacientes portadores de mutaciones en *BRCA2* ha quedado demostrado en los estudios previamente mencionados, el papel que desempeñan otras alteraciones más allá de *BRCA2* en la respuesta a estos fármacos no parece tan clara. Basta con observar las tasas de respuesta en el estudio TRITON2 en aquellos pacientes con defectos en otros genes diferentes a *BRCA*: 15% de respuestas radiológicas y 10% de respuestas por PSA¹⁸¹. De forma reciente, además, se ha

demostrado el escaso beneficio de los inhibidores de PARP e pacientes ATM¹⁷⁷. Por ello, es necesario estudiar otras alternativas terapéuticas para estos pacientes. Existen varios ensayos clínicos testando la eficacia de varios inhibidores de ATR, ATM o Chk, bien solos o en combinación con otros agentes, en pacientes portadores de alteraciones en *ATM*. Por otra parte, los tumores con alteraciones en *CDK12* y en genes MMR, debido a sus características particulares, podrían beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia^{139,144,158,182,183}, aunque los resultados son aún muy preliminares y es necesario realizar más estudios al respecto.

7.4.3 Combinaciones de inhibidores de PARP e inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos

Existen datos a nivel preclínico que sugieren una sinergia entre la inhibición del receptor de andrógenos (RA) y la inhibición de PARP. De esta manera, la inhibición de la señalización del receptor de andrógenos puede reducir la expresión de genes relacionados con la recombinación homóloga^{184,185}, induciendo un fenotipo HRR deficiente; y que PARP1, a su vez, está relacionado con la transcripción dependiente del receptor de andrógenos¹⁸⁶. En base a este racional, se han publicado de forma reciente 3 ensayos clínicos Fase 3 en los cuales se ha analizado la combinación de diferentes inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos con diferentes inhibidores de PARP en primera línea de CPRCm (PROpel, MAGNITUDE y TALAPRO-2)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. (Tabla 9). En cuanto a los criterios de inclusión, aunque existen diferencias, de una forma global, todos incluyeron pacientes en primera línea de CPRCm, en los cuales se permitía docetaxel y otros ARSi en escenarios previos, como el CPHSm o el CPRCnm, aunque el porcentaje de pacientes incluidos con estas características fue bajo, siendo, por tanto, una población escasamente representada de manera general en los 3 estudios.

En el estudio MAGNITUDE¹⁸⁹, a diferencia de los estudios PROpel y TALAPRO-2, se realizó un pre-screening molecular mediante el análisis de un panel de 9 genes relacionados con la recombinación homóloga, de tal manera que los pacientes se agrupaban en dos cohortes en base a la presencia/ausencia de alteraciones en estos genes (cohorte de pacientes HR positivos y negativos, respectivamente). Es el único de los 3 estudios diseñado para analizar el papel de la combinación de iPARP con un ARSi en

pacientes con y sin alteraciones en genes HR. En cada una de las cohortes, los pacientes se randomizaban a recibir la combinación de niraparib + abiraterona versus placebo + abiraterona. Se realizó un análisis intermedio en la cohorte HR negativa en el cual no se observó beneficio de la combinación de niraparib + abiraterona frente a placebo + abiraterona (HR 1,09; IC95% 0,75-1,57), declarando, por tanto, la futilidad en esta cohorte, que fue cerrada a reclutamiento. Por el contrario, sí se objetivó beneficio en la SLPr a favor de la combinación de niraparib + abiraterona en el grupo de pacientes portadores de alteraciones *BRCAl/2* (19,5 vs 10,9 meses; HR 0,55; IC95% 0,39-0,78; $p < 0,001$). De igual manera, la SLPr fue significativamente superior para todo el conjunto de pacientes HR positivos (16,5 vs 13,7 meses; HR 0,73; IC95% 0,56-0,96; $p = 0,022$). Sin embargo, cuando de este grupo HR positivos se excluyeron los pacientes *BRCAl/2*, no se observaron diferencias significativas entre ambos brazos de tratamiento (HR 0,99; IC95% 0,68-1,44), lo que sugiere que el mayor beneficio de la combinación de niraparib + abiraterona se obtiene en los pacientes *BRCAl/2*.

En cuanto al PROpel¹⁸⁷ y el TALAPRO-2¹⁸⁸, son estudios con un diseño diferente, en los cuales los pacientes se randomizaban a cada uno de los brazos de tratamiento (olaparib + abiraterona vs placebo abiraterona en el PROpel y talazoparib + enzalutamida vs placebo + enzalutamida en el TALAPRO-2) sin realizar una selección molecular (población denominada *all comers*). En ambos estudios se analizaron, o bien de forma retrospectiva (PROpel), o bien de forma prospectiva (TALAPRO-2) la presencia de alteraciones en genes relacionados con la recombinación homóloga. Ambos estudios han demostrado beneficio en la SLPr para la combinación de iPARP + ARSi en *all comers* (PROpel: 24,8 vs 16,6 meses, HR 0,66; $p < 0,001$ a favor de olaparib + abiraterona vs placebo + abiraterona; TALAPRO-2: mediana no alcanzada vs 21,9 meses, HR 0,63; $p < 0,001$ a favor de talazoparib + enzalutamida frente a placebo + enzalutamida). Se han realizado subanálisis en los cuales se demuestra que, aunque se obtiene beneficio de las combinaciones iPARP + ARSi en *all comers*, el mayor beneficio se observa en aquellos pacientes portadores de alteraciones en genes de la recombinación homóloga, especialmente en los pacientes *BRCA2*.

Aunque los resultados de estos estudios son muy interesantes, se debe tener en cuenta que las probabilidades de ofrecer esta combinación en la práctica clínica real están limitadas debido al escenario de tratamiento del cáncer de próstata avanzado. Actualmente la práctica totalidad de los pacientes que lleguen a la fase de resistencia a la castración metastásica (CPRCm), habrán recibido previamente un inhibidor de la

señalización del receptor de andrógenos o bien en CPSHm o en CPRCnm. Estas poblaciones, como se ha comentado previamente, no estaban representadas en los estudios MAGNITUDE, PROpel o TALAPRO-2. Será interesante conocer los resultados de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con estas combinaciones de tratamiento en etapas más tempranas, como el CPHSm.

Tabla 9: Características de los principales estudios con combinaciones de inhibidores de PARP e inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos en CPRCm

	PROpel ¹⁸⁷	MAGNITUDE ¹⁸⁹	TALAPRO-2 ¹⁸⁸
Tratamiento	Abiraterona (AA) Olaparib	Abiraterona (AA) Niraparib	Enzalutamida Talazoparib
Diseño del estudio	Fase III	Fase III	Fase III
Población	1L CPRCm <ul style="list-style-type: none"> No AA previa en CPRCm Permitidos otros ARSi si stop ≥ 12 meses antes Permitido docetaxel en CPHSm 	1L CPRCm <ul style="list-style-type: none"> Permitido inicio de AA ≤ 4 meses previos Permitido ARSi y docetaxel en CPSHm / CPRCnm 	1L CPRCm <ul style="list-style-type: none"> Permitido ARSi y docetaxel
Pacientes incluidos	N=796	N=400*	N=806
Cohortes	<i>All comers</i>	HR positivos y HR negativos	<i>All comers</i>
Objetivo primario	SLPr en <i>all comers</i>	SLPr en pacientes con alteraciones HR	SLPr en <i>all comers</i>
Tipo de material analizado	Plasma o tejido tumoral Análisis retrospectivo	Plasma o tejido tumoral Análisis prospectivo	Plasma o tejido tumoral Análisis prospectivo
Test	Plasma: FoundationOne®Liquid CDx Tejido: FoundationOne®CDx	Plasma: Resolution Biosciences Tejido: FoundationOne® CDx	Plasma: FoundationOne®Liquid CDx Tejido: FoundationOne® CDx
Genes analizados	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BARD1, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, RAD51B, RAD51D, RAD54L</i>	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDK12, CHEK2, FANCA, HDAC2, PALB2</i>	<i>ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CHEK2, FANCA, MLH1, MRE11A, NBN, PALB2, RAD51C</i>

Abreviaturas: CPRCm – Cáncer de próstata resistente a la castración metastásico; ARSi – Inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos; CPHSm – Cáncer de próstata hormonosensible metastásico; CPRCnm – Cáncer de próstata resistente a la castración no metastásico; SLPr – Supervivencia libre de progresión radiológica; HR – Recombinación homóloga.

*Número de pacientes incluidos en la cohorte de pacientes portadores de alteraciones en la recombinación homóloga.

7.4.4 Otras estrategias de tratamiento

Dado que los ensayos clínicos han demostrado un beneficio muy limitado de los iPARP en pacientes con determinadas alteraciones en genes de la reparación del ADN, se deben estudiar otras estrategias para estos pacientes. Existen varios ensayos clínicos o pre-clínicos que están testando la eficacia de varios inhibidores de ATR, ATM o Chk, ya sean solos o en combinación con otros agentes. En el caso de *CDK12*, se ha demostrado que su inactivación define un subgrupo de tumores de próstata caracterizados por una marcada inestabilidad genómica, con la presencia de duplicaciones en tándem, mayores niveles de infiltración de linfocitos T y neoantígenos^{144,182}. Por ello, los pacientes con mutaciones en *CDK12* podrían beneficiarse de la inmunoterapia^{139,144,158,182}. Existen datos de dos cohortes retrospectivas y multicéntricas, que han analizado en conjunto los resultados de 112 pacientes portadores de mutaciones en *CDK12*^{139,140}, de los cuales, 28 fueron tratados con inmunoterapia, demostrando respuestas incluso en aquellos casos que habían recibido múltiples líneas de tratamiento previo. Otro grupo de pacientes que parecen beneficiarse de la inmunoterapia son aquellos con alteraciones en genes MMR. En 2017, la FDA aprobó el tratamiento con pembrolizumab, un anti-PD1, para el tratamiento de tumores sólidos basado en la presencia de un biomarcador (defectos en genes MMR) y no en el origen del tumor primario. Sin embargo, en el caso del cáncer de próstata, un análisis exploratorio del estudio KEYNOTE-199, un Fase 2 en el que se analizaba la eficacia de pembrolizumab en pacientes con CPRCm, no demostró una correlación clara entre los defectos en genes MMR y la respuesta a este fármaco¹⁹⁰.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo pretende caracterizar desde un punto de vista clínico y molecular a pacientes con cáncer de próstata portadores de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN, como *BRCA1/BRCA2*, entre otros.

De forma reciente se ha demostrado la alta prevalencia de mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico. Sin embargo, los principales estudios publicados se han llevado a cabo en población anglosajona, y es bien conocido que la prevalencia de estas alteraciones puede variar en función del área geográfica debido a la existencia de diferentes trasfondos genéticos poblacionales.

Las mutaciones germinales en *BRCA2* están asociadas a mal pronóstico en pacientes con enfermedad localizada. Sin embargo, no se conoce su verdadero impacto en la enfermedad avanzada, ni tampoco el papel que pueden desempeñar estas alteraciones en *BRCA2* y otros genes relacionados con la reparación del ADN en la respuesta a los tratamientos convencionales del cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, como los taxanos e inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que los tumores de pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* presentan mayor inestabilidad genómica, presentando una elevada variación en el número de copias (CNVs), pero, hasta el momento, no se conoce el impacto que podrían tener estas alteraciones en el pronóstico de pacientes con cáncer de próstata.

Para finalizar, existen estudios que han sugerido que los tumores de pacientes portadores de alteraciones germinales en *BRCA2* tienen características histopatológicas asociadas a una mayor agresividad clínica, como los patrones cribiforme o intraductal. Si este hallazgo se confirma, la presencia de estos patrones histológicos podría respaldar la realización de la prueba de cribado germinal.

En base a todo ello, se han planteado las siguientes hipótesis:

1. La prevalencia de alteraciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN podría diferir en la población mediterránea en comparación con lo reportado previamente en población angloamericana.
2. Las mutaciones germinales en *BRCA2* y en otros genes relacionados con la reparación del ADN podrían estar asociadas a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.
3. La presencia de alteraciones germinales en *BRCA2* podría relacionarse con una mayor inestabilidad genómica, la cual, a su vez, podría explicar el pronóstico desfavorable de estos pacientes.
4. Determinadas características histológicas, como el patrón cribiforme y/o intraductal podrían estar asociados con la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*.

Basándonos en las hipótesis planteadas, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Analizar la prevalencia en población mediterránea de mutaciones germinales en genes implicados en la reparación del ADN en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.
2. Estudiar las implicaciones pronósticas y predictivas de las mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.
3. Analizar la prevalencia de alteraciones somáticas en *BRCA2*, *RBI*, *MYC* y *PTEN* en pacientes con cáncer de próstata portadores y no portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*.

4. Explorar el impacto clínico de las alteraciones somáticas frecuentemente asociadas a la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*.
5. Describir las características histopatológicas asociadas a la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Procedimientos de los estudios

Antes de llevar a cabo los procedimientos de cada estudio, incluyendo la recogida de datos y muestras, los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio en el que participaban, facilitándoles la información sobre los objetivos buscados, los posibles beneficios y eventos adversos derivados. De igual manera se explicaron los procedimientos a seguir y los posibles riesgos a los que pudieron estar expuestos. Tras esta información, los pacientes firmaron los consentimientos informados pertinentes. Todos los estudios fueron aprobados por las autoridades regulatorias y por todos los comités locales de los centros participantes.

2 Recogida de datos clínicos

Dentro de los diferentes estudios se recogieron los siguientes datos clínicos:

- Demográficos: Fecha de nacimiento.
- Antecedentes familiares: Historia familiar de cáncer (árbol genealógico).
- Antecedentes personales: Estado de portador conocido/desconocido para mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN.
- Datos basales al diagnóstico: Fecha de diagnóstico, PSA al diagnóstico, estadio tumoral (TNM), Gleason score*. En pacientes con CPRCm, fecha de resistencia a castración, tipo de progresión a la resistencia a castración (bioquímica y/o radiológica), fecha del primer diagnóstico de metástasis, ECOG, presencia de dolor y existencia de metástasis óseas, ganglionares y/o viscerales.
**Nota: El Gleason score, debido a la variabilidad inter-observador, fue revisado por un patólogo experto en tumores genito-urinarios (AGP).*
- Datos analíticos basales: Recogidos al diagnóstico de CPRCm y antes de cada línea de tratamiento sistémico para CPRCm. Hemoglobina, neutrófilos y linfocitos. Albúmina, lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA) y PSA.

- Tratamiento del tumor primario: Prostatectomía radical (fecha, linfadenectomía bilateral, borde afecto, Gleason score final, estadio patológico [TNM]), y/o radioterapia (fecha), hormonoterapia neo/adyuvante (<6 meses, ≥6 meses).
- Tratamiento sistémico: Documentar cada línea de tratamiento (incluyendo el inicio de análogos LH-RH para enfermedad avanzada), con fecha de inicio y fin de dosis, respuesta por PSA y fecha, progresión bioquímica y fecha, mejor respuesta radiológica y fecha, progresión radiológica y/o clínica y fecha de ambas.
- Seguimiento: Recidiva bioquímica, fecha y tratamientos recibidos. Recaída metastásica y fecha. Fecha de inicio de análogos para enfermedad avanzada y fecha de progresión a resistencia a castración (bioquímica y/o radiológica). Fecha de último seguimiento y/o exitus, causa de fallecimiento.
 - Pacientes con estadio localizado: PSA cada 3-6 meses. Seguimiento radiológico a criterio del investigador a partir de la recidiva bioquímica (definida por criterios Phoenix en el caso de tratamiento con radioterapia [aumento de PSA ≥ 2 ng/mL sobre el nadir] o por PSA $\geq 0,2$ ng/mL en el caso de prostatectomía radical).
 - Pacientes con CPRCm: Seguimiento clínico y evaluaciones de PSA cada 3-4 semanas. Seguimiento radiológico en base a las recomendaciones de las guías clínicas con pruebas (TC/RM/GGO) cada 12-16 semanas.

3 Recogida, almacenamiento y envío de muestras

En el momento de la inclusión en el estudio, se recuperaron las muestras tumorales de los archivos de Anatomía Patológica de los centros participantes y se enviaron al laboratorio de Cáncer de Próstata del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) para su procesamiento de manera homogénea. Estas muestras procedían de bloques fijados en formalina e incluidos en parafina procedentes de cilindros prostáticos, resecciones transuretrales, biopsias de lesiones metastásicas o prostatectomías. En el laboratorio, se anonimizaron asignándoles un código alfanumérico único y trazable para cada muestra. Una vez identificadas y revisadas de forma central por un patólogo (AGP), y marcadas las zonas de interés, se realizaron los siguientes procedimientos:

- Elaboración de matrices de tejidos (TMA) a partir de la obtención de varios cilindros por prostatectomía (3-6) de 1 mm de diámetro, representativos del tumor.
- Secciones completas de aquellas áreas que contenían al menos un 50% de tumor (en aquellos casos con un porcentaje menor, se procedió a realizar una macrodissección previa de la zona tumoral para disminuir el porcentaje de células no tumorales). Posteriormente se realizaron hasta 10 secciones de 5 micras de grosor cada una, para la extracción de ADN.
- Una vez procesados, los bloques de parafina de la biopsia y/o prostatectomía radical fueron devueltos al centro colaborador.

Para la extracción y análisis de ADN germinal se obtuvo una muestra de 5 mL de sangre periférica en tubos EDTA. Las muestras fueron almacenadas en cada uno de los centros participantes a -20°C hasta el momento del envío (en hielo seco) al laboratorio de Cáncer de Próstata de CNIO. La extracción de ADN se realizó siguiendo protocolos estandarizados (ver sección 4. Procedimientos experimentales) utilizando controles de calidad preestablecidos. Tras la extracción de ADN, se almacenaron alícuotas de 1 µg/muestra en ultracongelador a 80°C, previo etiquetado con un código alfanumérico único y trazable para cada muestra.

4 Procedimientos experimentales

4.1 Análisis de variantes en ADN germinal

- Extracción de ADN y cuantificación: La extracción del ADN germinal se realiza con el kit “*Flexigene DNA kit*” (QIAGEN, Germantown, MD), a partir de 1 mL de sangre periférica procedente de un tubo EDTA. Para ello, cada muestra se diluye en 2,5 mL de solución FG1 (incluida en el kit), se centrifuga a 2000 RCF durante 10 minutos y posteriormente se elimina el sobrenadante. A continuación, se disuelve el pellet en una solución de resuspensión a la que se añaden 5 µl de proteinasa K y se incuba durante 10 minutos a 65°C con el fin de eliminar todas las proteínas que se encuentran asociadas al ADN. El material genómico se precipita añadiendo 500 µl de isopropanol y centrifugando a 2000 RCF durante 5 minutos. Posteriormente se lava con etanol al 70%, se deja secar y

se resuspende en 300 µl de la solución FG3 (incluida en el kit). Para que la solución de ADN sea homogénea se incuba a 65°C durante toda la noche y al día siguiente se transfiere a un tubo eppendorf® de 1,5 mL y se mantiene a 65°C con agitación durante 3 horas más. Tras la extracción, el ADN se cuantifica mediante “*Qubit™ dsDNA HS Assay Kit*” (Life Technologies, Frederick, MD) que permite realizar una cuantificación fluorimétrica específica del ADN de doble cadena usando el “*Qubit 2.0 Fluorometer*” (Life Technologies, Frederick, MD). Antes de pasar al siguiente paso, todas las muestras deben pasar el control de calidad: OD260/OD280 > 1,8 y OD260/OD230 > 1,5. Tras la extracción, el ADN se almacena en alícuotas a -80°C hasta su posterior uso.

- Construcción de librerías (“*KAPA HyperPlus Prep*” [Roche Sequencing, Pleasanton, CA]): La síntesis de las librerías se realiza partiendo de 250-500 ng de ADN germinal extraído con el protocolo anteriormente descrito. Para evitar que los restos de EDTA interfirieran con la fragmentación enzimática posterior, se limpian las muestras de ADN a través de una incubación con 3 volúmenes de “*AMPure Beads*” (Beckman Coulter, Indianapolis, IN), seguido de un lavado con etanol al 80% y resuspensión en 35 µl de 10mM Tris-HCl pH 8. Posteriormente se realiza una fragmentación enzimática incubando las muestras a 37°C durante 20 minutos, para obtener un tamaño de unas 200-400 pares de bases, seguida de una reparación de los extremos y una adición de una cola PoliA. Para poder identificar cada una de las muestras, se realiza una ligación de secuencias únicas diferenciales para cada una de ellas utilizando “*KAPA Dual-Index Adapters*” del kit (Roche Sequencing, Pleasanton, CA). Por último, se lleva a cabo una amplificación pre-captura mediante 6 ciclos de PCR utilizando la enzima “*KAKA HiFi HotStart Ready Mix*” (Roche Sequencing, Pleasanton, CA) con el fin de obtener una cantidad suficiente de librería para poder capturarla. Tras cada uno de los pasos mencionados es preciso realizar un lavado con “*AMPure Beads*” (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) con el fin de eliminar los restos de las soluciones empleadas en cada paso previo.

- Captura y secuenciación del ADN germinal (“*SeqCap EZ Pure Capture Bead Kit*” y “*SeqCap EZ Hybridization and Wash Kit*” [Roche Sequencing, Pleasanton, CA]) : Para llevar a cabo los objetivos 1 y 2 se diseñó un panel específico compuesto por 107 genes implicados en el proceso de reparación del ADN (Tabla 10), incluyendo *ATM*,

BRCA1, *BRCA2* y *PALB2* entre otros. De promedio, se obtuvieron de 2 a 3 millones de lecturas de 100 pb cada una, con una cobertura media superior a 150X para cada muestra. Todas las variantes patogénicas y probablemente patogénicas fueron validadas mediante un segundo método (Sanger o electroforesis multicapilar ABI 3730xls [SegGen, Torrance, GA], reacción en cadena de la polimerasa o MLPA), utilizando el servicio central de genómica de CNIO.

Tabla 10: Lista completa del panel de 107 genes analizados, todos relacionados con la reparación del ADN

APEX1	DDB1	FAM175B	GTF2H3	MSH4	PARP2	RAD51D	XAB2
APEX2	DMC1	FANCA	GTF2H4	MSH5	PARP3	RAD52	XPA
APLF	EME1	FANCB	GTF2H5	MSH6	PMS1	RAD54B	XPC
ATM	EME2	FANCC	KIAA0415	MUS81	PMS2	RAD54L	XRCC1
ATR	EPCAM	FANCD2	LIG4	MUTYH	PNKP	RBBP8	XRCC2
BARD1	ERCC1	FANCE	MBD4	NBN	PRKDC	RPA1	XRCC3
BRCA1	ERCC2	FANCF	MLH1	NEIL1	RAD9A	RPA2	XRCC4
BRCA2	ERCC3	FANCG	MLH3	NEIL2	RAD17	RPA3	XRCC5
BRIP1	ERCC4	FANCI	MMS19	NEIL3	RAD23A	SLX1A	XRCC6
CDK7	ERCC5	FANCL	MNAT1	NHEJ1	RAD23B	SLX1B	
CDK12	ERCC6	FANCM	MPG	NTHL1	RAD50	SLX4	
CHEK1	ERCC8	GEN1	MRE11A	OGG1	RAD51	SMUG1	
CHEK2	FAAP20	GTF2H1	MSH2	PALB2	RAD51B	TDG	
DCLRE1C	FAAP24	GTF2H2	MSH3	PARP1	RAD51C	UNG	

El proceso de captura se realiza a partir de 1 µg de ADN procedente de un pool con concentraciones equimolares de cada una de las librerías a analizar. Sobre este pool de ADN se añaden 5 µL de COT, 5 µL de Universal Bloquing Oligos (UBOs) diseñados para bloquear los adaptadores que contienen las librerías, de tal forma que no interfieran en futuras amplificaciones, y dos volúmenes de “*AMPure Beads*” (Beckman Coulter, Indianapolis, IN). La mezcla se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, se capturan las “*AMPure Beads*” con una gradilla magnética, se lavan con etanol al 80%, se dejan secar durante 5 minutos y se resuspenden con “*SeqCap EZ probe*” compuesto por las sondas anteriormente descritas (panel de 107 genes). Tras un choque térmico de 5 minutos a 95°C, se incuba la muestra a 47°C durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, se procede a la limpieza de esta mezcla con unas bolas de captura que van a reconocer de forma específica las sondas de nuestro panel pre-diseñado siguiendo las instrucciones

incluidas en el kit. Tras ello, se lleva a cabo una incubación durante 45 minutos a 47°C, seguida de varios lavados y posterior separación de la librería de las “*AMPure Beads*” con ayuda de la gradilla magnética. Por último, se realiza una amplificación post-captura mediante 13 ciclos de PCR y una última purificación de la muestra con las “*AMPure Beads*”.

- Procesamiento y control de calidad de los datos de secuenciación: El primer paso en esta etapa consiste en la transformación de los archivos. bcl del secuenciador NextSeq 500 a archivos. fastq usando la herramienta de des-multiplexación de Illumina, bcl2fastq (Illumina, San Diego, CA). Posteriormente, las secuencias se mapean con el genoma humano de referencia hg19 de la Universidad de California Santa Cruz (versión de febrero de 2009) usando la herramienta de alineamiento Bowtie2 ¹⁹¹. Las lecturas duplicadas se eliminan utilizando la función Picard RemoveDuplicated (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Posteriormente se realiza la re-alineación y re-calibración de las secuencias (con las funciones Realigner TargetCreator e IndelRealigner disponibles en <http://software.broadinstitute.org/gatk/>) siguiendo las prácticas propuestas por el GATK ^{192–194}. El estudio de las variantes se realiza sobre los archivos. BAM generados tras el re-alineamiento y el re-calibrado. Para la clasificación de las variantes se usan los datos incluidos en las bases UnifiedGenotyper y HaplotypeCaller disponibles en GATK. Los archivos .vcf son filtrados y anotados con Annovar ¹⁹⁵. Adicionalmente, los archivos .vcf se enriquecen con herramientas de predicción de patogenicidad disponibles en dbNSFP v3.0 (<http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/DbNSFP>)¹⁹⁶ junto con datos poblacionales (base de datos ExAC, de población europea no finlandesa ¹⁹⁷, el servidor de variantes español CIBERER [<http://csvs.babelomics.org/>]) y la información clínica y genómica de ClinVar ¹⁹⁸.

De forma paralela al proceso de análisis, se realiza un exhaustivo control de calidad de las muestras secuenciadas. La calidad del procedimiento de secuenciación se evalúa mediante una serie de marcadores, como el porcentaje de lecturas mapeadas, el porcentaje de lecturas mapeadas en la región de interés, el porcentaje de lecturas duplicadas y el porcentaje de lecturas mapeadas en la región de interés con una cobertura de 20X. La eficiencia final de secuenciación de cada muestra se mide mediante la relación entre las secuencias elegibles para la determinación de variantes y el número inicial de lecturas mapeadas.

- Clasificación de las variantes: Se descartaron aquellas variantes germinales con una frecuencia alélica igual o superior al 0,5% en la población general (usando como referencia la base de datos ExAC v3.0), a menos que estuvieran reconocidas como claramente patogénicas y asociadas a cáncer. El resto de las variantes se filtraron y clasificaron como patogénicas o probablemente patogénicas según la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)¹⁹⁸, ANNOVAR (<https://annovar.openbioinformatics.org/>), en base a las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, por sus siglas en inglés, *American College of Medical Genetics and Genomics*)¹⁹⁹. Aquellas variantes no reportadas previamente, o aquellas reportadas como variantes de significado incierto (VUS) fueron revisadas de manera independiente por al menos 3 investigadores con formación en genética del cáncer, incluyendo el doctorando (EC, NRL, RL).

4.2 Caracterización molecular de muestras parafinadas

La caracterización molecular de las muestras tumorales se ha llevado a cabo mediante dos técnicas: hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés *Fluorescent in situ hybridization*) y secuenciación del genoma a baja cobertura (LP-WGS por sus siglas en inglés *Low-Pass Whole Genome Sequencing*) con el fin de detectar variaciones en el número de copias en determinados genes del ADN.

Las variaciones en el número de copias del ADN (CNVs por sus siglas en inglés – *Copy number variation*) son un tipo de alteración estructural, en la que existe un aumento o una pérdida en la secuencia del genoma humano normal que afecta a un número considerable de pares de bases. Para detectar CNVs se emplean técnicas citogenéticas, como puede ser la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o la hibridación genómica comparativa (aCGH por sus siglas en inglés, *array-comparative genomic hybridization*). Uno de los principales inconvenientes de estas técnicas es que solo pueden detectar grandes cambios estructurales. De forma más reciente se ha demostrado que la secuenciación del genoma a baja cobertura (profundidad $\leq 10X$) puede ser una técnica útil para detectar y evaluar CNVs²⁰⁰, postulándose como una alternativa más rentable y de mayor resolución que aCGH o FISH. En nuestro caso, se ha llevado a cabo análisis de las muestras tumorales mediante FISH y LP-WGS, comparando ambas técnicas, utilizando como “gold standard” el FISH, como se comentará más adelante con detalle.

4.2.1 Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH)

En el presente estudio se realizó la técnica de FISH para detectar la pérdida cromosómica grosera de *BRCA2*, *RBI*, *PTEN*, la amplificación/ganancia de *MYC* y el reordenamiento de *TMPRSS2-ERG*. En algunos casos se emplearon sondas comerciales, mientras que, en otros, se fabricaron sondas específicas a partir de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) (Tabla 11).

Tabla 11: Sondas empleadas para el análisis mediante FISH

Localización		Sondas	Posicion/referencia	Fluoróforo
<i>BRCA2</i>	13q13.1 (<i>BRCA2</i>)	RP11-37E23	chr13:32231813-32398469	FISHBright™550 Red/Orange
	13q34Tel	SureFISH 13qTel (Agilent)	chr13:114739948-115096638	SureFISH 429 Aqua
<i>RBI</i>	13q14.2 (<i>RBI</i>)	Vysis™ LSI 13 RB1	Abott™ #00884999000797	Spectrum Orange
	13q34Tel	SureFISH 13qTel (Agilent)	chr13:114739948-115096638	SureFISH 429 Aqua
<i>MYC</i>	8q24.21 (<i>MYC</i>)	Vysis™ LSI MYC	Abott™ #00884999006256	Spectrum Orange
	8p11.1-q11.1	Vysis™ CEP 8 (D8Z2)	Abott™ #00884999019966	Spectrum Green
<i>PTEN</i>	10q23.2 - 10q23.31 (3' <i>PTEN</i>)	RP11-210E13	chr10:87650651-87833563	FISHBright™550 Red/Orange
	10q23.31 (5' <i>PTEN</i>)	RP11-765C10	chr10:87955466-88138888	FISHBright™495 Green
	10p11.1-q11.1	Vysis™ CEP 10	See Abott™ #00884999021754	Spectrum Aqua

- Elaboración de sondas para hibridación *in situ* fluorescente:

Para el diseño de sondas de ADN se seleccionan secuencias específicas contenidas en BACs a partir de la literatura ¹¹⁶ y de mapas genéticos obtenidos de la base de datos del UCSC Genome Browser. Para cada caso se han seleccionado las BACs pertinentes (ver tabla 11).

Los clones de *Escherichia coli* competentes que contienen cada una de las BACs seleccionadas fueron adquiridos de Invitrogen, crecidas en medio Lurie Broth (LB) más cloranfenicol, y su ADN extraído mediante método de lisis alcalina. Posteriormente, mediante la técnica de GenomiPhi, utilizando el kit comercial “*Illustra™ GenomiPhi V2 DNA*” (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), se realiza una amplificación inespecífica del ADN extraído. A continuación, el ADN es marcado de forma directa con “*FISHBright™ Nucleic Acid Labelling Kit*” (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, NL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez marcadas las sondas, se precipitan con COT-1 a 1ng/μL y esperma de salmón a una concentración de 10ng/μL para disminuir la hibridación de las secuencias repetitivas inespecíficas obtenidas durante el proceso de amplificación de las BACs. La hibridación específica de todas las sondas fue testada en metafases celulares (CGH Target Slides Normal Metaphases, Abbott Laboratories, Des Plaines, IL).

- Hibridación *in situ* fluorescente:

Se hibridan las secciones de tejido de 4 μm con las sondas obtenidas como se indica en la sección anterior. De forma resumida, se elimina la parafina de las secciones mediante incubación a 60°C durante toda la noche, y su inmersión en xileno a 50°C (10 min x 3 veces). Tras ello, se pasan por concentraciones decrecientes de alcohol, 100% y 70% para la rehidratación de la muestra (1 min en cada condición). La preparación del tejido para la hibridación se realiza por calor, mediante la inmersión de las *slides* en 50 mL de *SPOT-Light® Tissue Pretreatment Solution* a 98°C durante 30 min. A continuación, se realiza una digestión con pepsina (entre 3 y 5 min, dependiendo del tipo de muestra). Tras 2 lavados con agua destilada, las muestras se incuban con 300 ng (200 ng/μL) de cada sonda junto con 0,5 μL de una mezcla compuesta por COT-1 (10X) y esperma de salmón (1X) en un hibridador automático (Dako, Fort Collins, CO) con una fase inicial de desnaturalización a 85°C por 5 min, seguidos de una fase de hibridación a 37°C durante toda la noche.

Tras la hibridación, se realizan 2 lavados consecutivos en buffer SCC 20X (5 min) y 50% de formamida (4 min) a 45°C para remover el exceso de sondas no hibridadas. Después, se continúan los lavados con PBS 1X (5 min x 2 veces) y etanol 70% (1 min x 2 veces). Las *slides* se tiñen finalmente con la solución de montaje Vectashield que contiene 4',6'-dihidrocloruro diamidino-2-fenilindol (DAPI) (VectorLabs, Burlingame, CA).

- Lectura e interpretación de resultados:

Para la visualización y análisis de los resultados se utiliza la plataforma Ariol SL-50 (Leica Biosystems, Richmond, IL), donde las slides se escanean a 40X.

La evaluación de los resultados fue realizada de manera independiente por dos observadores, incluyendo el doctorando (EC y RL). Siempre que fue posible, se evaluaron al menos 100 núcleos por cada caso. La interpretación de cada uno de los genes analizados se detalla en las figuras 9 a 13 y se resume a continuación.

Clasificación FISH de *BRCA2*:

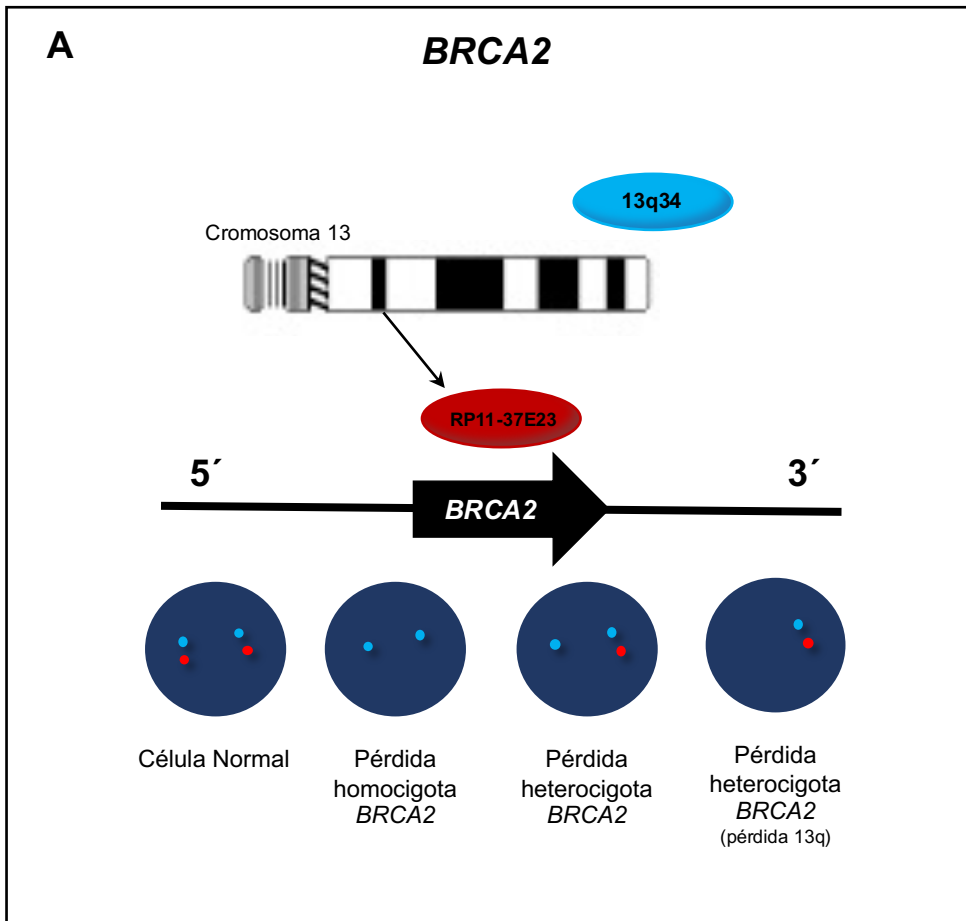


Figura 9. A) Técnica de FISH para detectar pérdida de *BRCA2*. Los núcleos en interfase se hibridan con las sondas: 13q13.1 (sonda *BRCA2*: RP11-37E23 – Roja) y 13q34 (sonda subtelomérica 13q: SureFISH 13q34Tel de Agilent – Azul claro)

-Célula normal: Presencia de las 4 sondas (2 rojas correspondientes a *BRCA2* y 2 azules correspondientes al telómero 13q) en el núcleo.

-Célula con pérdida homocigota: Ausencia de ambas sondas marcando *BRCA2* (rojas), conservando las 2 sondas correspondientes al telómero 13q.

-Célula con pérdida heterocigota: Ausencia de una de las sondas correspondientes a *BRCA2* (roja), conservando la otra copia de *BRCA2* y las dos sondas correspondientes al telómero 13q. Cuando existe una pérdida completa del brazo del cromosoma, podemos encontrar ausencia de una de las sondas rojas (*BRCA2*) y ausencia de una de las sondas azules (telómero 13q) denominado como pérdida del 13q.

Para poder catalogar un caso con pérdida de *BRCA2* por FISH, se debe llevar a cabo la lectura de al menos 100 células, en las cuales $\geq 50\%$ de los núcleos leídos deben ser clasificados como pérdida homo- o heterocigota.

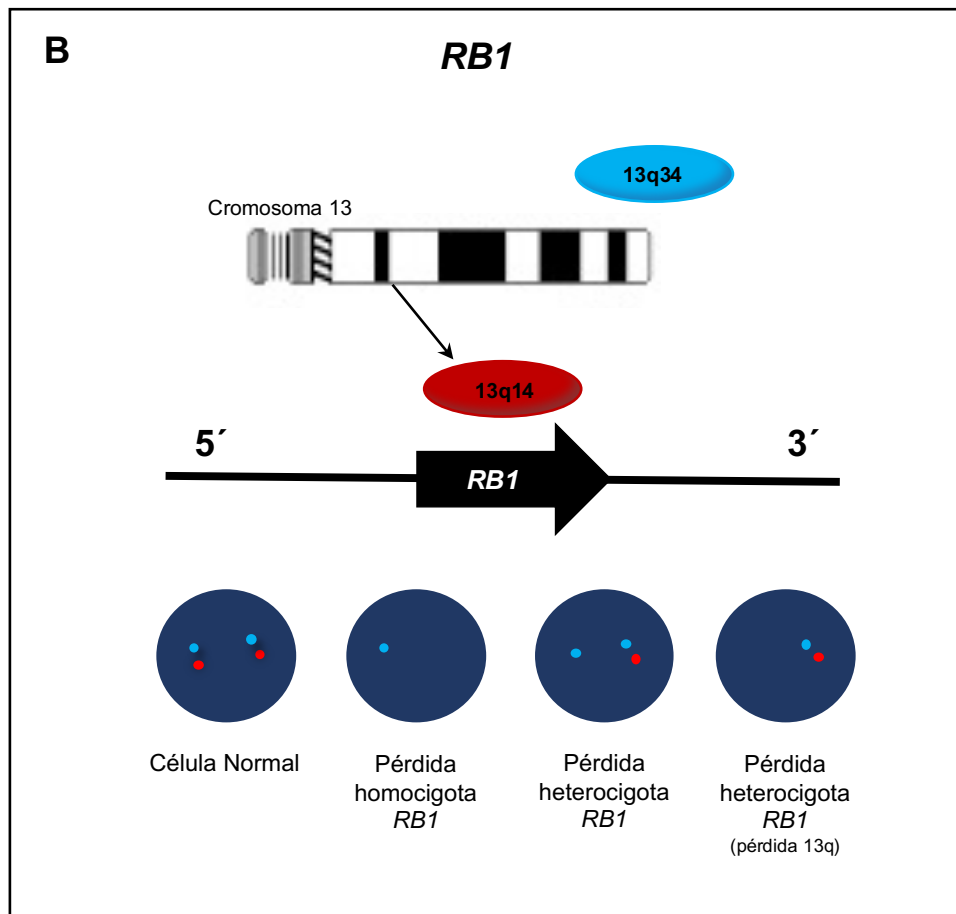
Clasificación FISH de *RB1*:

Figura 10. B) Técnica de FISH para detectar pérdida de *RB1*. Los núcleos en interfase se hibridan con las sondas: 13q14.2 (sonda *RB1*: Vysis LSI 13Rb1 de Abbott – Roja) y 13q34 (sonda sub-telomérica 13q: SureFISH 13q34Tel de Agilent – Azul claro)

-Célula normal: Presencia de las 4 sondas (2 rojas correspondientes a *RB1* y 2 azules correspondientes al telómero 13q) en el núcleo.

-Célula con pérdida homocigota: Ausencia de ambas sondas marcando *RB1* (rojas), conservando las 2 sondas correspondientes al telómero 13q.

-Célula con pérdida heterocigota: Ausencia de una de las sondas correspondientes a *RB1* (roja), conservando la otra copia de *RB1* y las dos sondas correspondientes al telómero 13q. Cuando existe una pérdida completa del brazo del cromosoma, podemos encontrar ausencia de una de las sondas rojas (*RB1*) y ausencia de una de las sondas azules (telómero 13q) denominado como pérdida del 13q.

Para poder catalogar un caso con pérdida de *PTEN* por FISH, se debe llevar a cabo la lectura de al menos 100 células, en las cuales $\geq 50\%$ de los núcleos leídos deben ser clasificados como pérdida homo- o heterocigota.

Clasificación FISH de *PTEN*:

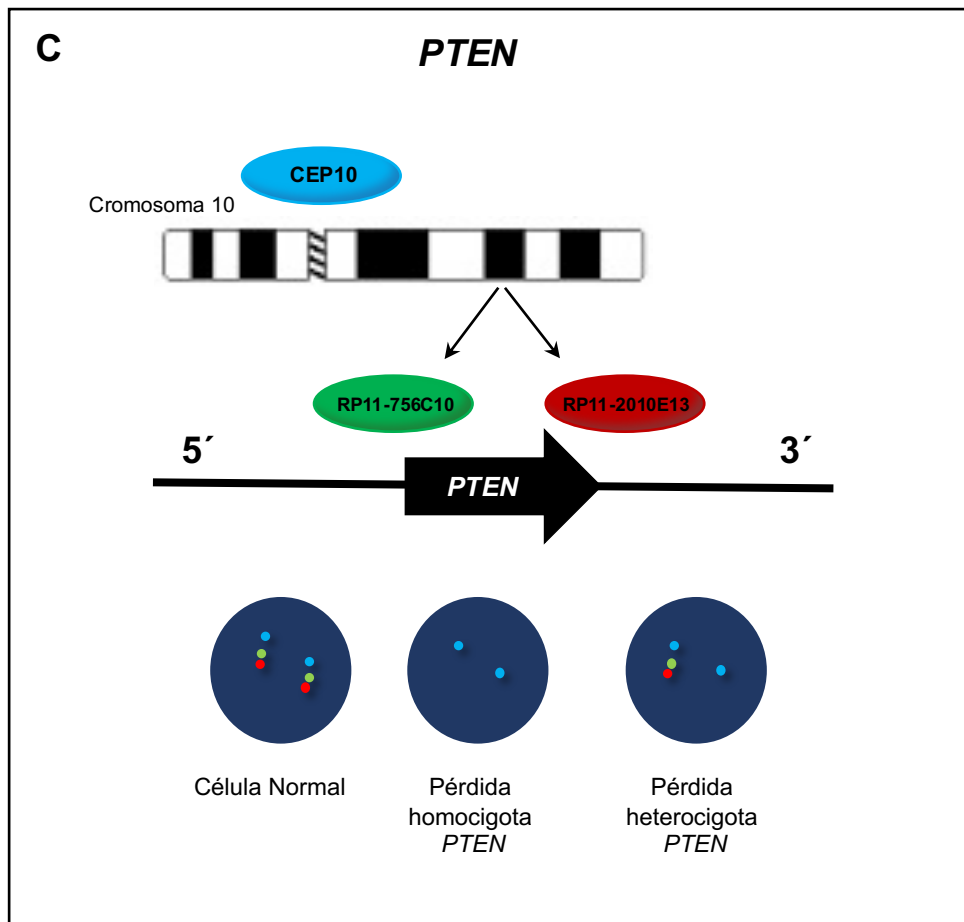


Figura 11. C) Técnica de FISH para detectar pérdida de *PTEN*. Los núcleos en interfase se hibridan con las sondas: 10q23.3 (sonda 3'*PTEN*: RP11-2010E13 – Roja y 5'*PTEN*: RP11-756C10 – verde) y CEP10 (sonda del centrómero 10: Vysis CEP10 de Abbott – Azul claro)

-Célula normal: Presencia de las 6 sondas (2 rojas y 2 verdes correspondientes a *PTEN* y 2 azules correspondientes al centrómero 10) en el núcleo.

-Célula con pérdida homocigota: Ausencia de todas las sondas marcando *PTEN* (rojas y verdes), conservando las 2 sondas correspondientes al centrómero 10.

-Célula con pérdida heterocigota: Ausencia de una de las sondas roja y verde correspondientes a *PTEN*, conservando la otra copia de ambas y las dos sondas correspondientes al centrómero 10.

Para poder catalogar un caso con pérdida de *PTEN* por FISH, se debe llevar a cabo la lectura de al menos 100 células, en las cuales $\geq 50\%$ de los núcleos leídos deben ser clasificados como pérdida homo- o heterocigota.

Clasificación FISH de *MYC*:

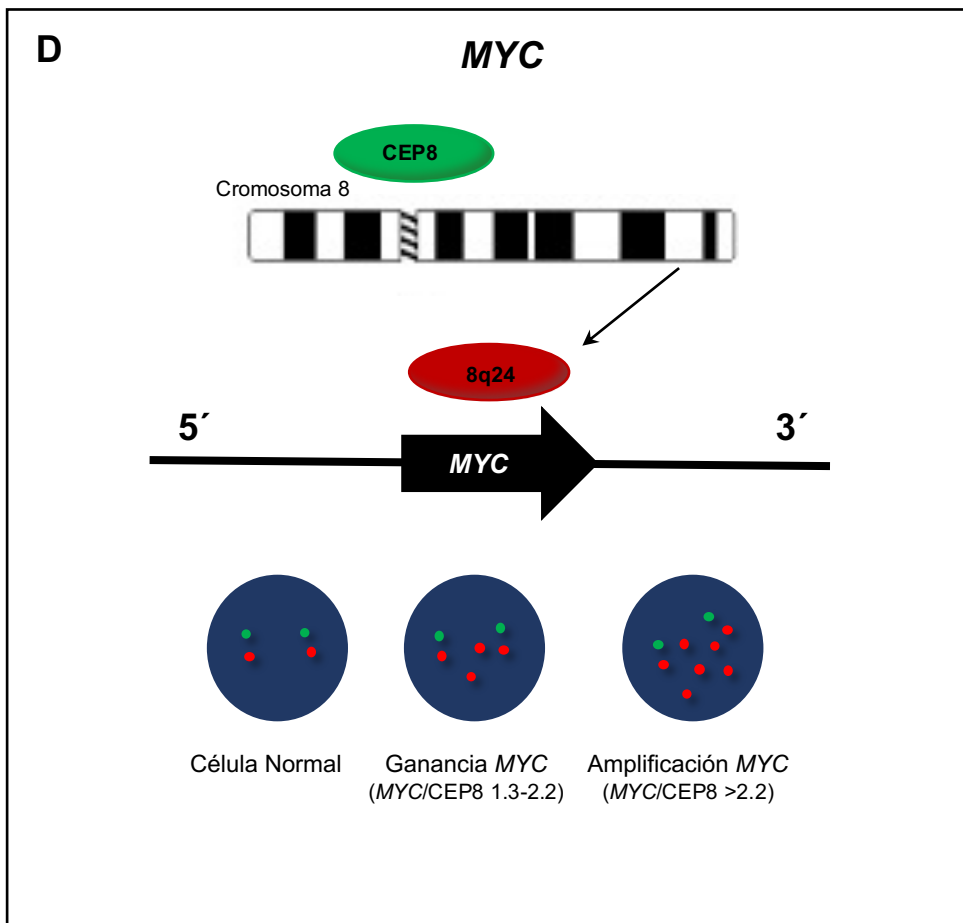


Figura 12. D) Técnica de FISH para detectar amplificación/ganancia de *MYC*. Los núcleos en interfase se hibridan con las sondas: 8q24.21 (sonda *MYC*: Vysis LSI MYC de Abbott – Roja) y CEP8 (sonda del centrómero 8: Vysis CEP8 de Abbott – verde)

-Célula normal: Presencia de las 4 sondas (2 rojas correspondientes a *MYC* y 2 verdes correspondientes al centrómero 8) en el núcleo.

-Célula con ganancia de *MYC*: Aumento en el número de copias de la sonda roja (*MYC*), con respecto al número de copias de sonda verde (centrómero 8), con una proporción entre 1,3 y 2,2.

-Célula con amplificación de *MYC*: Aumento del número de copias de la sonda roja (*MYC*), con respecto al número de copias de sonda verde (centrómero 8), con una proporción superior a 2,2.

Para poder catalogar un caso con ganancia/amplificación de *MYC* por FISH, se debe llevar a cabo la lectura de al menos 100 células, en las cuales $\geq 20\%$ de los núcleos leídos deben ser clasificados como tal ²⁰¹.

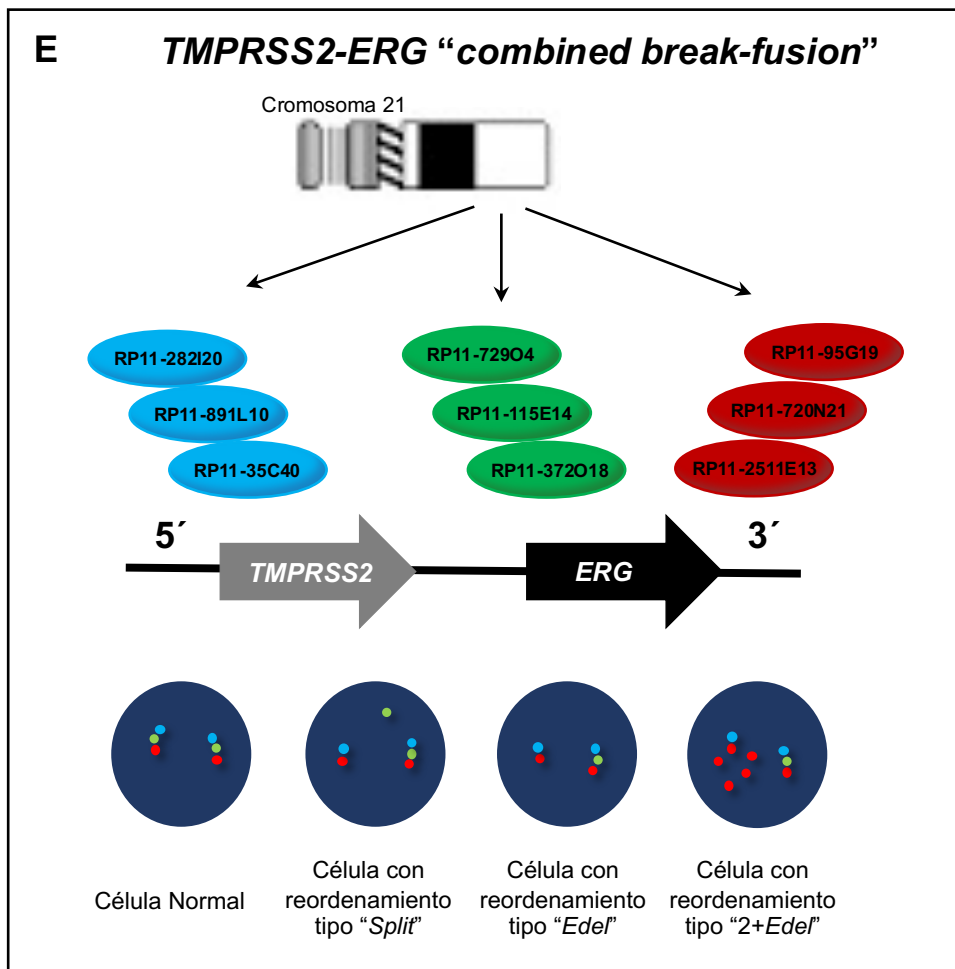
Clasificación FISH de *TMPRSS2-ERG*:

Figura 13. E) Técnica de FISH para detectar reordenamiento de *TMPRSS2-ERG*. Los núcleos en interfase se hibridan con las sondas: *ERG* (sonda 3' *ERG*: RP11-95G19, RP11-720N21, RP11-2511E13 – Roja y sonda 5' *ERG*: RP11-729O4, RP11-115E14, RP11-372O18 – Verde) y *TMPRSS2* (sonda 5' *TMPRSS2*: RP11-282I20, RP11-891L10, RP11-35C40 – Azul claro)

-Célula normal: Presencia de las 6 sondas (2 rojas y 2 verdes correspondientes a *ERG* y 2 azules correspondientes a *TMPRSS2*) en el núcleo.

-Célula con reordenamiento tipo translocación o *split*: Se mantienen las 6 sondas, pero las señales pertenecientes a *ERG*, 3' roja y 5' verde se encuentran separadas la una de la otra debido a una traslocación con inserción.

-Célula con reordenamiento tipo delección o *Edel*: En este caso se observa la ausencia de la señal verde correspondiente a 5' *ERG* ya que hay delección de esta parte del

gen. Cuando en estos casos el reordenamiento se asocia con la presencia de ≥ 2 señales rojas 3' *ERG*, se conoce como 2+*Edel*.

Para poder catalogar un caso con reordenamiento de *TMPRSS2-ERG* por FISH, se debe llevar a cabo la lectura de al menos 100 células, en las cuales $\geq 50\%$ de los núcleos leídos deben ser clasificados como tal (bien fuera translocación o delección).

4.2.2 Secuenciación de genoma completo a baja cobertura (LP-WGS)

Se realizó la técnica de secuenciación de genoma completo a baja cobertura (LP-WGS, por sus siglas en inglés: *Low-Pass Whole-Genome Sequencing*) en las muestras de tejido parafinado, para detectar variaciones en el número de copias en *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* y *MYC*. Los pasos llevados a cabo fueron los siguientes:

- Tinción con hematoxilina y eosina: Para ello se parte de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina montadas en portaobjetos en secciones de unos 3 μm de grosor. Para llevar a cabo el protocolo, estos portaobjetos se calientan 30 minutos a 60°C y se incuban en xileno durante 20 minutos para eliminar la parafina. Posteriormente se hidratan pasando por concentraciones decrecientes de etanol hasta llegar a un baño de 5 minutos en agua destilada. Tras ello, se tiñen durante 5-10 minutos en Hematoxilina de Harris que da el color morado a la cromatina del núcleo y a las grandes agregaciones ribosomales del citoplasma. Para resaltar esa tinción, las muestras se lavan con agua durante 2 minutos. En segundo lugar, se sumergen durante 30 segundos en Eosina alcohólica, que tiñe de color rosado el citoplasma. Por último, las muestras se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol, y se sellan en un portaobjetos utilizando DepEx (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como medio de montaje.

- Extracción de DNA tumoral (“QUICK-DNA FFPE Kit” [Zymo Research, Irvine, CA]): Para obtener el ADN tumoral de las muestras, estas fueron identificadas y revisadas de forma central por un patólogo (AGP), marcando las zonas de interés sobre una de las secciones previamente teñidas con HE. Para la extracción es necesario seleccionar entre 2 y 10 secciones de parafina, dependiendo del tamaño del tumor (biopsia vs prostatectomía), las cuales se deben teñir con HE, pero sin realizar el último paso de

sellado con DepEx. Con un bisturí se realiza una macrodissección de la zona de interés, y se va depositando el material obtenido en la tapa de un tubo eppendorf® de 1,5 mL que contiene 8 µL de agua destilada, 8 µL de 2X Digestion Buffer y 2 µL de Proteínasa K, incluidos en el kit “*QUICK-DNA FFPE*” (Zymo Research, Irvine, CA). Tras la macrodissección, los tubos se agitan con vortex, se sellan con Parafilm® y se incuban durante toda la noche a 55°C. Para inactivar la Proteínasa K, se realiza un choque térmico de 20 minutos a 94°C, tras el cual, se elimina el ARN mediante una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente con RNase A. Las muestras se diluyen en 350 µL de Genomic Lysis Buffer, se añaden 135 µL de isopropanol para conseguir la precipitación del material genético y se transfieren a una columna incluida en el kit. Posteriormente se lavan repetidas veces y se eluyen en 32 µL de DNA Elution Buffer mediante incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente y posterior centrifugación a velocidad máxima durante 30 segundos. La concentración de ADN se mide mediante Qubit (siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo en la cuantificación del ADN germinal, sección 4.1). Igualmente, las muestras deben pasar el control de calidad de manera previa al siguiente paso: OD260/OD280 > 1,8 y OD260/OD230 > 1,5.

- Construcción de librerías de ADN somático (“*NEBNext FFPE DNA Repair Mix*” y “*NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina®*” [New England Biolabs, Ipswich, MA]): Las muestras anteriormente obtenidas de la macrodissección de la zona tumoral se diluyen para obtener 50 ng de ADN en 27 µL de agua. Se procede a su fragmentación mecánica, mediante sonicación con baño de ultrasonidos durante 3-5 minutos totales, alternando ciclos de 30 segundos en el baño y 30 segundos en hielo, para obtener un tamaño de unas 200-250 pares de bases.

De forma previa a la síntesis de la librería, se trata el ADN con un kit que contiene una mezcla de enzimas formuladas específicamente para reparar los daños en el ADN causados por la inclusión de la muestra en parafina. Después se limpia la muestra con 2,2 volúmenes de “*AMPure Beads*” incubándola durante 7 minutos a temperatura ambiente y capturando posteriormente las “*AMPure Beads*” con ayuda de una gradilla magnética. Se lavan con etanol al 80%, se dejan secar y se resuspenden en 25 µL de 0,1xTE. Se vuelven a capturar las “*AMPure Beads*” con la gradilla magnética y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo eppendorf® donde se lleva a cabo la preparación de la librería. La síntesis comienza reparando los extremos de los fragmentos de ADN añadiendo una cola de PoliA mediante incubación durante 30 minutos a 20°C seguida de otros 30

minutos a 65°C. Posteriormente se añade un adaptador universal a través de una reacción de ligación a 20°C durante 15 minutos. Las muestras se capturan en un proceso de incubación con 1,3 volúmenes de “AMPure Beads”, lavado con etanol a 80% y resuspensión en 10,5 µL de 0,1xTE. A continuación, cada librería se marca e identifica con un index universal y un index específico de cada muestra que permite diferenciar posteriormente que lectura corresponde a cada paciente. Se amplifica la librería llevando a cabo 9 ciclos de PCR para aumentar la cantidad obtenida. Por último, se realiza una captura mediante incubación con 1 volumen de “AMPure Beads”, lavado con etanol al 80% y resuspensión en 33 µL de 0,1xTE. La concentración y tamaño de las librerías obtenidas se miden con Qubit y Bioanalyzer.

-Procesamiento y control de calidad de los datos de secuenciación: Para la comparación de los datos de CNVs obtenidos mediante FISH y LP-WGS, se integró un flujo de trabajo “Snakemake”²⁰². Los análisis computacionales se llevaron a cabo en la Unidad de Bioinformática de CNIO. El análisis de LP-WGS se realiza incluyendo bloques tumorales de tejido fijado en formalina e incluido en parafina de pacientes con cáncer de próstata, incluyendo también 22 bloques de individuos sanos como controles de referencia. Las muestras se secuenciaron mediante la plataforma Illumina (Illumina, San Diego CA) con una secuenciación de 150 bases “paired-end”, lo cual se traduce en una secuenciación de lecturas pareadas de fragmentos de ADN en ambos sentidos 5’ y 3’, en este caso de 150 pares de bases.

Los adaptadores de la secuencia en bruto se eliminan a través de Cutadapt v.1.16²⁰³. Los programas FastQC v.0.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y MultiQC v.1.7²⁰⁴ se emplean para llevar a cabo los controles de calidad pertinentes. Las alineaciones de las lecturas con el genoma humano de referencia GRCh38 (GENCODE 28) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.26/) se realizan con BWA-mem v.0.7.17²⁰⁵. De manera previa, el genoma de referencia es filtrado para eliminar cromosomas parcheados o secuencias desconocidas, preservando los cromosomas autosómicos (cromosomas 1-22) y los cromosomas sexuales (cromosomas X e Y) a través de un script personalizado en Phyton²⁰⁶.

Tras el alineamiento, los duplicados se eliminan utilizando el software Picard 2.9.2 (MarkDuplicates) (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). MarkDuplicates maneja lecturas inter cromosómicas y mantiene un par de lecturas por cada librería²⁰⁷. Para

normalizar el número de lecturas alineadas resultantes, de cada librería se escoge una muestra de 20 millones de lecturas. Este paso se realiza mediante SAMtools v.1.9 ²⁰⁵ y un script personalizado en Python. En cada uno de los pasos relativos a los archivos de alineación, se lleva a cabo un control cualitativo y cuantitativo con SAMtools, Picard y Qualimap2 v.2.2.2a ²⁰⁸, como se indica en la figura 14.

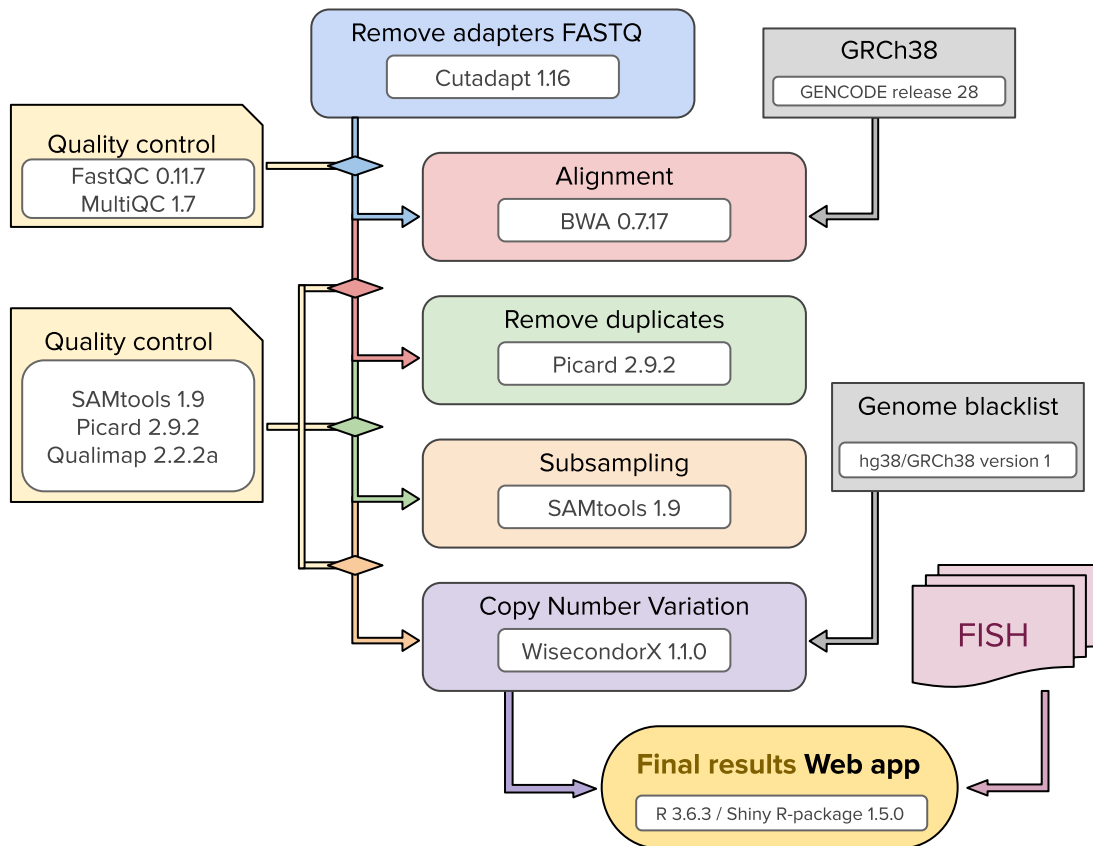


Figura 14: Diagrama de flujo de trabajo de todos los pasos llevados a cabo en el análisis de datos, con las distintas versiones de los programas empleados.

Para llevar a cabo el análisis de CNVs se ha tenido en cuenta que el genoma humano alberga muchas zonas repetitivas como regiones satélites, centrómeros y telómeros que impiden una correcta normalización ²⁰⁹. Por ello, es necesario elaborar una “blacklist” del genoma utilizado incluyendo este tipo de regiones (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>) y se incluye también la “blacklist” generada por el proyecto ENCODE, versión 1 ²¹⁰.

Una vez llevado a cabo este paso, la determinación de CNVs se realiza mediante WisecondorX ²⁰⁹. En relación con la cobertura observada en las muestras analizadas y las

pruebas que se llevaron a cabo, se determinó que el tamaño óptimo de la ventana de intervalo era de 85kb. Se obtuvo así una lista de segmentos con las diferentes áreas que presentaban una pérdida o una ganancia significativa en el número de copias.

Los valores de las pérdidas y ganancias de aquellos segmentos cuyas coordenadas coinciden con los genes de interés (*BRCA2*, *RBI*, *MYC* y *PTEN*) se comparan con los resultados obtenidos mediante FISH, que en este caso fue tomada como técnica de referencia o “gold standard”. De esta manera, la matriz que compara ambas metodologías era la siguiente:

		FISH	
		Positivo	Negativo
LP-WGS	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

Abreviaturas: VP – Verdaderos Positivos; FP – Falsos Positivos; FN – Falsos Negativos; VN – Verdaderos Negativos.

En el caso de *BRCA2*, los diferentes escenarios posibles se detallan en la siguiente tabla:

	LP-WGS	FISH	Resultado
Caso 1	Pérdida	Pérdida	VP
Caso 2	--	Pérdida	FN
Caso 3	Pérdida	--	FP
Caso 4	--	--	VN

Abreviaturas: VP – Verdaderos Positivos; FP – Falsos Positivos; FN – Falsos Negativos; VN – Verdaderos Negativos.

-- “Hace referencia a cualquier valor que no sea pérdida en este caso (nulo, no significativo o ganancia)

De la misma manera se calcula la especificidad, sensibilidad, así como otras métricas que pueden ser ampliadas en las siguientes referencias ²¹¹. Además, se ha elaborado una aplicación web dinámica en R v.3.6.3 ²¹² utilizando el paquete Shiny de R v.1.5.0 ²¹³, donde se pueden comparar los resultados obtenidos mediante LP-WGS y FISH de forma dinámica, así como la tabla de métricas finales (Figura 15).

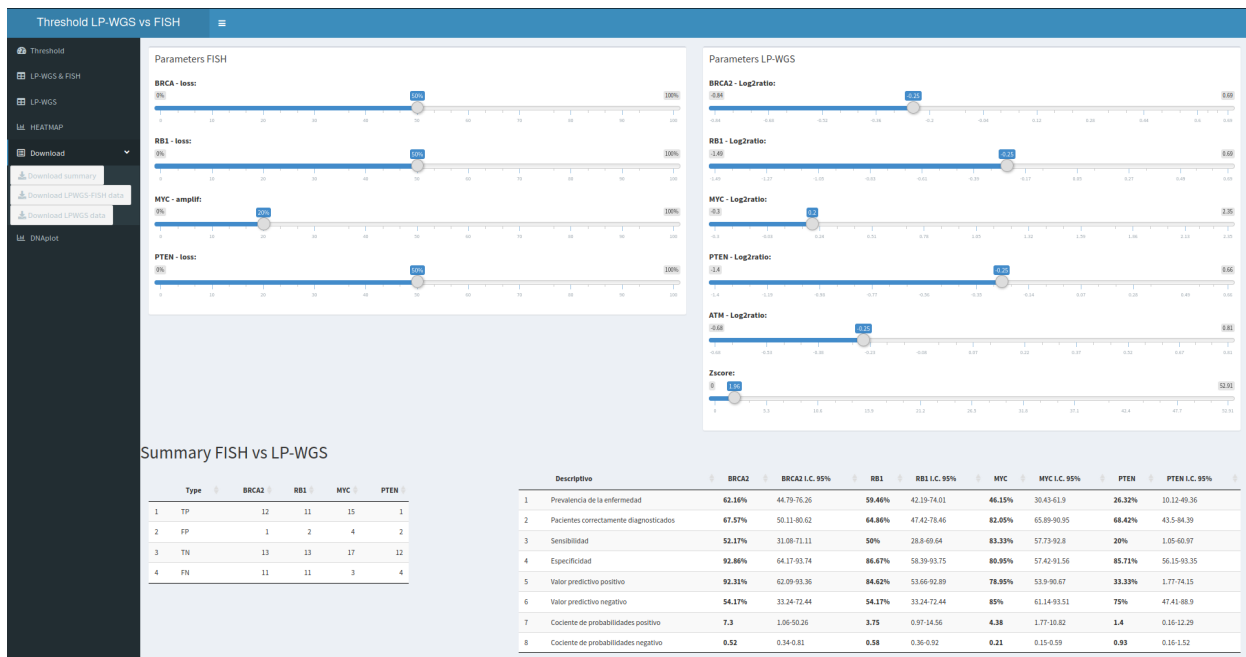


Figura 15: Captura de pantalla de una sección de la aplicación Web hecha con R y el paquete Shiny.

Interpretación de resultados: La visualización de los plots de ADN de cada uno de los casos se lleva a cabo como se ha comentado previamente mediante Shiny, un paquete del programa R (Figura 16) con el fin de valorar la magnitud del cambio en la escala logarítmica y determinar su correspondencia con los resultados FISH para establecer los diferentes puntos de corte de las pérdidas, ganancias o amplificaciones.

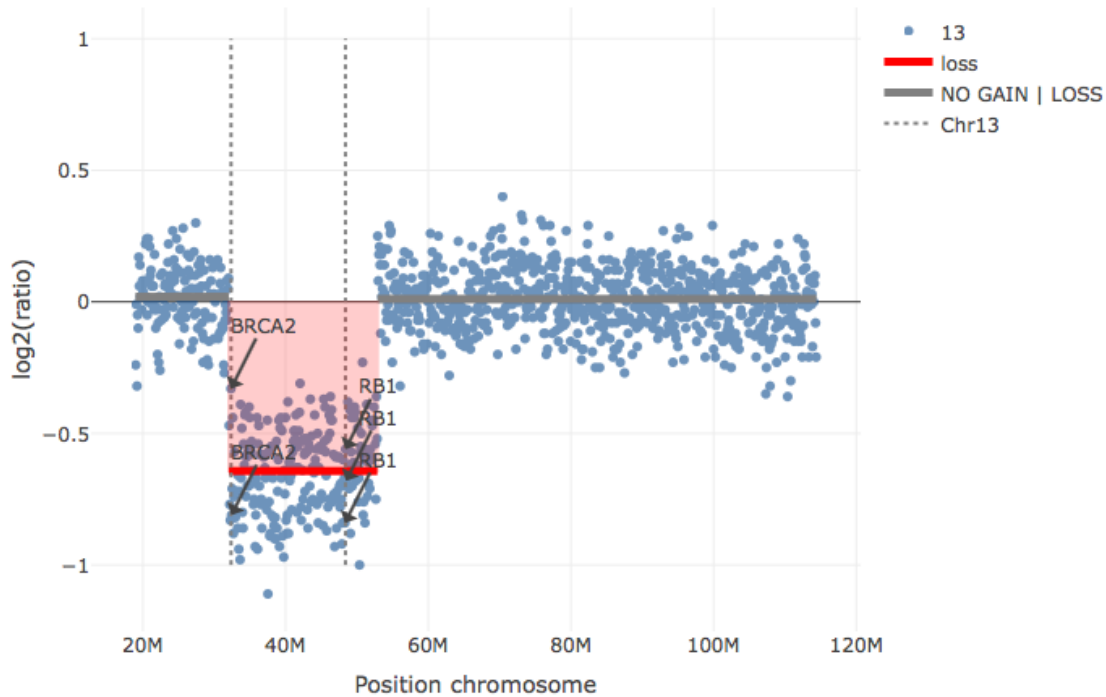


Figura 16: Representación gráfica del DNA plot del cromosoma 13 de un caso analizado (04_02). Se puede observar cómo existe una pérdida conjunta de *BRCA2* (32.889.611-32.973.809 pb) y *RB1* (48.877.883-49.056.122 pb). Los puntos azules representan cada una de las lecturas de los segmentos (ventana de 85kb). Las líneas de puntos discontinuas señalan las posiciones de los genes *BRCA2* y *RB1* dentro del cromosoma 13. La línea gris horizontal indica que no existen cambios significativos en las lecturas de esas regiones. La línea roja horizontal y la zona sombreada en rojo representan una región donde existe una pérdida en el número de copias significativa, en este caso con una magnitud de pérdida en la escala logarítmica de -0,65 (\log_2).

4.3 Análisis histopatológico de muestras parafinadas

Para llevar a cabo el objetivo 5, fue necesario realizar un análisis histopatológico de las muestras tumorales de pacientes con y sin mutaciones germinales en *BRCA2*. Esta revisión fue llevada a cabo de manera externa por dos patólogos expertos en tumores genitourinarios de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins (DCS, TL). Con el fin de evitar sesgos de interpretación por parte de los patólogos, ambos fueron “ciegos” para la clasificación de las muestras como casos (portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*) y controles (no portadores de mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN).

Para la clasificación morfológica de las muestras se examinaron secciones tumorales teñidas de hematoxilina y eosina (ver protocolo previamente) de los bloques de parafina. Se puntuaron de manera independiente cada uno de los casos con la presencia o ausencia de morfología intraductal y/o cribiforme a través de un análisis histológico. Para la identificación de morfología intraductal se utilizaron criterios morfológicos previamente publicados ³², que se resumen en la tabla 12 (más detalles en la introducción, sección 3.3).

Tabla 12: Criterios morfológicos para la identificación de morfología intraductal.

<p>Proliferación epitelial neoplásica llenando las glándulas o acinos, preservando las células basales y:</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Patrón cribiforme sólido o denso <ul style="list-style-type: none"> o - Patrón cribiforme laxo o patrón micropapilar con: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Atipia nuclear marcada (x6 tamaño nuclear normal) ✓ Comedonecrosis no focal

Además, se realizaron técnicas de inmunohistoquímica con marcadores de células basales, en este caso frente a la proteína p63, para la confirmación histológica de la presencia de morfología intraductal (inmunotinción de p63 utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p63 [4A4] [Abcam, Cambridge, MA] y el dispositivo Ventana Discovery [Roche Diagnostics, Indianapolis, IN]).

- Inmunohistoquímica con marcadores de células basales: Se utilizan secciones de tejido parafinado de 3 µm de grosor que se desparafinan y rehidratan mediante incubaciones con xilol y etanol en concentraciones decrecientes. Seguidamente se realiza la presentación de antígeno con citrato de sodio pH 6, anulando la actividad de la peroxidasa endógena mediante un baño en peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 10 minutos. Se bloquean los sitios de unión específica con suero de cabra al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para la inmunotinción específica de las células basales se usa el anticuerpo monoclonal 4A4 p63 de ratón (Abcam, Cambridge, MA), que posteriormente detecta mediante el sistema Ventana Discovery (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

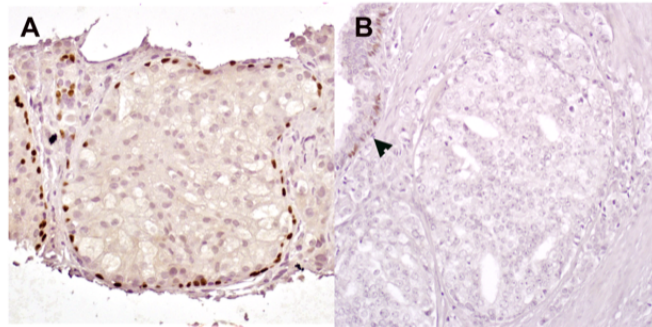


Figura 17: Imagen de inmunohistoquímica con tinción de células basales para realizar el diagnóstico diferencial entre carcinoma intraductal y carcinoma cribriforme. (A) La inmunotinción con p63 pone de relieve las células basales (núcleos marrones) que rodean una proliferación sólida de células citológicamente malignas, confirmando el diagnóstico de carcinoma intraductal. (B) La inmunotinción con p63 es positiva en las glándulas benignas circundantes (flecha), pero está ausente en la proliferación cribriforme de células de cáncer de próstata, confirmando el diagnóstico de carcinoma cribriforme.

5 Análisis estadístico

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

El tamaño muestral del estudio PROREPAIR-B se determinó en base a su objetivo principal, concretamente la inferencia estadística de una asociación entre la supervivencia global y la presencia de mutaciones deletéreas germinales en los 4 genes que *a priori* se esperaban fueran los de mayor prevalencia en nuestra población. Para el cálculo del tamaño muestral, se empleó el método propuesto por Rubinstein²¹⁴, asumiendo una prevalencia de mutaciones en línea germinal en los genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* y *PALB2* igual o superior al 5% en pacientes con CPRCm; una mediana de SCE de 30 meses en el grupo de no portadores, y una hazard ratio (HR) para SCE de pacientes con CPRCm igual o superior a 3 en portadores de mutaciones germinales en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2*

frente a no portadores. Para poder demostrar nuestra hipótesis, con un nivel α de 0,05 y un valor β de 0,20, el estudio requirió la inclusión de al menos 408 pacientes para observar al menos 171 muertes relacionadas con cáncer de próstata, durante un período de reclutamiento de 30 meses y un seguimiento mínimo de 8 meses. *A priori* el estudio permitía el reclutamiento en exceso de hasta un 10% de pacientes elegibles por posibles pérdidas de información y/o seguimiento.

Las tasas de respuesta, incluyendo la disminución de PSA $\geq 50\%$ (PSA50) y las respuestas radiológicas objetivas (TRO), así como los criterios del tiempo transcurrido hasta el evento (supervivencia causa específica [SCE], supervivencia libre de progresión [SLP], supervivencia libre de progresión 2 [SLP2] y tiempo a la progresión por PSA [TPPSA]) se definieron según el protocolo, siguiendo los criterios del PCWG2 ²¹⁵. Para la obtención de las curvas de supervivencia y estimar las medianas en cada variable de supervivencia libre de eventos, se empleó el método Kaplan-Meier. Las curvas de supervivencia para cada subgrupo se compararon mediante el test de log-rank. Los análisis univariados de asociación se complementaron con análisis multivariados mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline BRCA2 mutation carriers

El tamaño muestral del estudio PROREPAIR-A, que cuenta con un diseño de casos y controles emparejados por características clínicas diagnósticas del cáncer de próstata, se fundamenta en la confirmación del valor pronóstico de las mutaciones germinales deletéreas en *BRCA2*. Dada la naturaleza retrospectiva de la identificación de muchos de los casos y controles, se optó por la comparación directa de la razón de odds (u *odds ratio*, OR) entre dos grupos de tamaño preestablecido ²¹⁶. Se estimó una tasa de SCE a 10 años de $\leq 40\%$ y $\geq 70\%$ para portadores y no portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*, respectivamente ²¹⁷. Teniendo en cuenta un nivel de significación bilateral del 5%, una potencia del 90% y una proporción de 1 portador por cada 2 no portadores, se necesitaban al menos 141 pacientes para el análisis de la variable principal, donde al menos 47 debían ser portadores de mutaciones germinales. Inicialmente se incluyeron 240 pacientes, 80 tríos de casos y controles en una proporción 1:2. Dado que algunos casos y controles no

disponían de tejido tumoral y/o datos de seguimiento, hasta 40 pacientes (7 casos y 33 controles) fueron excluidos del estudio. Esta pérdida de casos no dio lugar a desequilibrios significativos entre los casos y controles restantes.

Se emplearon análisis estadísticos descriptivos para resumir las características de los pacientes y las muestras. La asociación, correlación y concordancia entre el estado de mutaciones en línea germinal, la presencia de alteraciones en el número de copias (CNV) a nivel somático y los subtipos histológicos se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado, la correlación de Pearson y el Kappa de Cohen, respectivamente. Otras asociaciones entre las características del paciente/tumor y el estadio de mutaciones en línea germinal se analizaron mediante las pruebas de Chi-cuadrado, tendencia lineal de Mantel-Haenszel o U de Mann-Whitney, según procediera. Todos los tiempos transcurridos hasta el evento se definieron a partir del diagnóstico inicial de cáncer de próstata y se evaluaron mediante el método de Kaplan-Meier. Las curvas de supervivencia resultantes se compararon mediante el test de log-rank. Se realizaron análisis univariados y multivariados mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Associations between BRCA2 alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer

Este subanálisis derivado del estudio PROREPAIR, no fue basado en un cálculo estadístico formal del tamaño de la muestra. Concretamente, su tamaño fue determinado por el número de tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* elegibles que pudieron ser emparejados según los criterios pre-especificados en una proporción 1:2 con controles elegibles.

Se emplearon estadísticas descriptivas para resumir las características de los pacientes y de la muestra. La prevalencia de las variantes de IDC y CRIB en tumores de próstata de los casos y controles se comparó mediante la prueba de Chi-cuadrado. Otras asociaciones entre las características del paciente/tumor y el estado de mutaciones germinales en *BRCA2*, así como las variantes histológicas IDC/CRIB, se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado, tendencia lineal de Mantel-Haenszel o U de Mann-Whitney, según procediera. Se emplearon modelos de análisis de regresión logística

mutlivariable (MVA) para evaluar asociaciones significativas independientes con las características IDC y/o CRIB. Estos modelos incluyeron las variables de emparejamiento, las variables asociadas a la presencia de IDC, CRIB y mutaciones germinales *BRC A2*, así como cualquier variable no equilibrada entre ambos grupos que pudiera actuar como posible factor de confusión.

Para llevar a cabo los análisis anteriormente expuestos, se emplearon los programas estadísticos SPSS versión 19 (*Statistical Package for the Social Sciences*, IBM Corp, Armonk, NY) y R versión 3.3.3.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 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

Relacionado con los objetivos 1 y 2

1. Analizar la prevalencia en población mediterránea de mutaciones germinales en genes implicados en la reparación del ADN en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.

2. Estudiar las implicaciones pronósticas y predictivas de las mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.

De forma reciente, varios análisis han puesto de manifiesto que los pacientes con cáncer de próstata avanzado presentan una elevada prevalencia, en torno al 12%, de alteraciones a nivel germinal en genes relacionados con la reparación del ADN^{99,104-106,118,121} (ver introducción, sección 7.2), siendo *BRCA2* el gen más comúnmente alterado en todos los estudios. La gran mayoría de estos análisis se han llevado a cabo en población británica o norteamericana^{104,106}, y es bien conocido que la prevalencia de las alteraciones germinales puede variar en función del área geográfica analizada debido a la existencia de diferentes trasfondos genéticos poblacionales y la presencia de mutaciones fundadoras en ciertos grupos étnicos o pueblos²¹⁸.

Además, se ha demostrado que la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2* es un factor independiente de mal pronóstico en pacientes con cáncer de próstata localizado, estando asociado con una menor supervivencia causa-específica y una menor supervivencia libre de metástasis en comparación con los no portadores^{137,150}. Por otra parte, las alteraciones tanto a nivel somático como germinal en *BRCA1/2* son un factor predictivo de respuesta a los inhibidores de PARP. Sin embargo, no está totalmente dilucidado cuál es el impacto que pueden tener estas mutaciones en relación con la respuesta a los tratamientos convencionales en cáncer de próstata avanzado, como los taxanos o ARSi, ya que la evidencia científica es, en cierta medida, contradictoria (ver introducción, sección 7.3.2).

Por lo tanto, y debido a la creciente realización de estudios genómicos en pacientes con cáncer de próstata, es fundamental conocer con mayor profundidad la prevalencia y las repercusiones clínicas que suponen las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en estos pacientes.

En base a todo ello se ha llevado a cabo un estudio de cohorte, prospectivo y multicéntrico, denominado PROREPAIR-B (NCT03075735), en el cual han participado 38 centros hospitalarios en España. Se incluyeron pacientes en el momento del diagnóstico de cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, los cuales debían tener confirmación histológica y estado desconocido de mutación germinal para genes relacionados con la reparación del ADN. Se realizó un seguimiento prospectivo de los mismos hasta su fallecimiento o pérdida de seguimiento. Los pacientes debían ser candidatos a comenzar un tratamiento de primera línea para CPRCm con alguna de las terapias que en el momento de la inclusión habían demostrado aumento de la supervivencia global (docetaxel, cabazitaxel, abiraterona, enzalutamida o radio-223) dentro de los primeros 6 meses tras el diagnóstico de resistencia a castración. La indicación de los tratamientos administrados fue a elección del investigador.

Se obtuvo una muestra de sangre periférica con el fin de analizar el ADN germinal. Este análisis incluyó un panel de 107 genes, todos ellos relacionados con la reparación del ADN (tabla 10, en apartado de material y métodos).

NOTA: La metodología empleada se explica de forma más detallada en el apartado de material y métodos.

El objetivo principal fue analizar el impacto de las alteraciones a nivel germinal en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* y *PALB2* en la supervivencia causa-específica desde el diagnóstico de enfermedad metastásica y resistente a la castración, y analizar la prevalencia de las alteraciones germinales en el panel pre-establecido.

Los objetivos secundarios incluyeron el análisis del impacto de las mutaciones germinales en otros grupos de genes/genes por separado, con un enfoque particular en *BRCA2*. Se analizaron diferentes endpoints, como el tiempo a la progresión por PSA

(TPPSA), supervivencia libre de progresión (SLP), respuestas por PSA y respuestas radiológicas de acuerdo a la línea de tratamiento (ARSi o taxanos).

Se incluyeron un total de 419 pacientes entre los meses de enero de 2013 y abril de 2016, de los cuales, el 98% eran caucásicos con ascendencia española. En el momento del diagnóstico de cáncer de próstata, la mediana de edad de los pacientes era de 66,2 años (rango 40,8-92,1), y aproximadamente la mitad (48,2%) presentaron enfermedad metastásica *de novo*. De los 419 pacientes, 26 (6,2%) fueron portadores de mutaciones germinales patogénicas/probablemente patogénicas en *BRCA2* (n=14), *ATM* (n=8) o *BRCA1* (n=4), no encontrándose mutaciones en *PALB2*. Considerando el panel completo de 107 genes, la prevalencia de mutaciones germinales patogénicas/probablemente patogénicas fue del 16,2% (n=68). La prevalencia de mutaciones en el conjunto de genes objetivo del análisis principal (*ATM/BRCA1/BRCA1/PALB2*) fue significativamente mayor en nuestra población de pacientes con CPRCm en comparación con las poblaciones incluidas en las bases de datos de pacientes sin cáncer española -CSVS- (6,2% vs 0,7%; p<0,001) e internacional -ExAC- (6,2% vs 0,9%; p<0,001). La odds ratio (OR) para el estado de portador de mutaciones germinales en pacientes con CPRCm comparados con las poblaciones españolas e internacional sin cáncer fue muy superior para algunos de los genes analizados, incluyendo *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* y *MRE11A*. Considerando el panel completo de 107 genes, la OR para el estadio de portador de mutaciones germinales en nuestra población de CPRCm comparada con ExAC y CSVS fue de 1,4 (IC95% 1,1-1,8; p=0,021) y 3,2 (IC95% 2,3-4,5; p>0,001), respectivamente (Tabla 13).

En el estudio publicado por Pritchard *et al*, el más amplio hasta el momento, con datos de 692 pacientes con cáncer de próstata avanzado, se reportó una prevalencia inferior a la del PROREPAIR-B, con un 11,8% de mutaciones germinales. Se debe tener en cuenta que en el estudio de Pritchard *et al*, se realizó un análisis de un panel de 20 genes asociados a predisposición al cáncer, mientras que en PROREPAIR-B este panel era más amplio, de 107 genes, de los cuales, 18 eran comunes al panel del estudio angloamericano.

Si tenemos en cuenta estos 18 genes que ambos estudios tenían en común, casi la mitad de los pacientes portadores en PROREPAIR-B albergaban una mutación en alguno de ellos; un 7,4% en comparación con 11,7% en la serie de Pritchard *et al*. En este estudio, las mutaciones fundadoras Ashkenazi en *BRCA1* c.52666dupC y en *BRCA2* c.5946delT

representaron el 66% y el 24% de todas las mutaciones identificadas en estos dos genes, respectivamente. De forma similar, la mutación fundadora de Europa del Este en *CHEK2* p.1100del representaba el 50% de todas las mutaciones en este gen. Estas 3 mutaciones, que en conjunto suponían el 22% de todas las alteraciones de la serie de Pritchard *et al*, no se hallaron en ninguno de nuestros 419 pacientes, como era esperable al no estar presentes en población española^{218,219}. Sin embargo, *BRCA2* fue el gen más frecuentemente mutado en ambas series, aunque con una prevalencia ligeramente menor en PROREPAIR-B (3,3%) con respecto a la reportada previamente (5,2%). El segundo gen más comúnmente alterado en nuestra serie fue *MUTYH* (3,1%). Todos los casos, salvo uno, se correspondieron con las variantes p.Y179C y p.G396D, que representan el 80% de las mutaciones *MUTYH* en población caucásica. Las mutaciones en este gen están presentes en torno al 1-2% de la población europea, pero su asociación con la predisposición al cáncer de próstata sigue sin estar clara^{220,221}. Por otra parte, la prevalencia de las alteraciones en *ATM* y *PALB2* en nuestra serie fue de 1,9% y 0%, respectivamente. Aunque la primera fue ligeramente superior y la segunda inferior a las reportadas en la serie de Pritchard *et al*, ambas frecuencias son similares a las reportadas en pacientes con cáncer de mama en población española^{222,223}. Hasta la fecha, no se han descrito mutaciones fundadoras o recurrentes en *ATM* o *PALB2* en nuestra población.

Tabla 13: Prevalencia de mutaciones germinales patogénicas en los genes de reparación del ADN analizados en la población PROREPAIR-B con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico en comparación con poblaciones de pacientes sin cáncer – Exome Aggregation Consortium (ExAC) y la población del Servidor de Variantes Española CIBERER (CSVS).

Gen	PROREPAIR-B	ExAC	PROREPAIR-B vs ExAC		CSVS	PROREPAIR-B vs CSVS	
	n=419 %	n=53.105 %	OR (IC 95%)	p-valor	n=1.551 %	OR (IC 95%)	p-valor
<i>ATM</i>	1,91%	0,26%	7,4 (3,6-15,2)	<0,001	0,19%	10,0 (2,7-38,0)	0,004
<i>BRCA1</i>	0,95%	0,18%	5,3 (1,9-14,4)	<0,001	0,13%	7,5 (1,4-40,9)	0,021
<i>BRCA2</i>	3,34%	0,30%	11,5 (6,6-20,1)	<0,001	0,26%	13,4 (4,4-40,8)	<0,001
<i>PALB2</i>	0%	0,12%	-----	1	0,13%	-----	1
<i>ATM / BRCA1 BRCA2 / PALB2</i>	6,21%	0,87%	7,6 (5,0-11,4)	<0,001	0,71%	9,3 (4,5-18,9)	<0,001
Panel 107 genes	16,23%	12,15%	1,4 (1,1-1,8)	0,021	5,67%	3,2 (2,3-4,5)	<0,001
Panel BROCA*	7,40%	2,15%	3,6 (2,5-5,3)	<0,001	1,35%	5,8 (3,3-10,2)	<0,001

* *ATM, ATR, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, FAM175A, GEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, XRCC2.*

Abreviaturas: OR – Odds ratio.

A la hora de ofrecer un servicio de asesoramiento genético apropiado, la selección para el cribado de mutaciones germinales se ha basado de forma tradicional en los antecedentes personales y/o familiares de cáncer. Según las guías clínicas, se considera que un probando es candidato para el cribado genético cuando la probabilidad de identificar una mutación patogénica es $\geq 10\%$.

En la serie de Pritchard *et al*, el 70% de pacientes portadores tenían un pariente de primer grado con antecedentes de cáncer, frente a un 50% en los no portadores ($p=0,001$). Esto se traduce en que alrededor del 30% de los pacientes portadores de mutaciones germinales no tenían antecedentes familiares de cáncer que hicieran sospechar la presencia de estas alteraciones.

En PROREPAIR-B, en el momento de la inclusión, 96 pacientes (22,9%) reportaron antecedentes familiares de cáncer, cifra significativamente superior en el grupo de portadores de mutaciones en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* que en los no portadores (73,1% vs 19,6% $p < 0,001$). Los pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* fueron los que tuvieron una mayor presencia de historia familiar de cáncer (85,7% vs 20,7%; $p > 0,001$). Sin embargo, alrededor del 15% de los pacientes identificados como portadores no tenían historia familiar previa de cáncer. El cáncer de mama y el cáncer de ovario fueron los tipos de tumor más frecuentemente reportados entre los familiares afectados. Treinta y nueve pacientes presentaron antecedentes familiares de primer o segundo grado con cáncer de próstata (Figura 18).

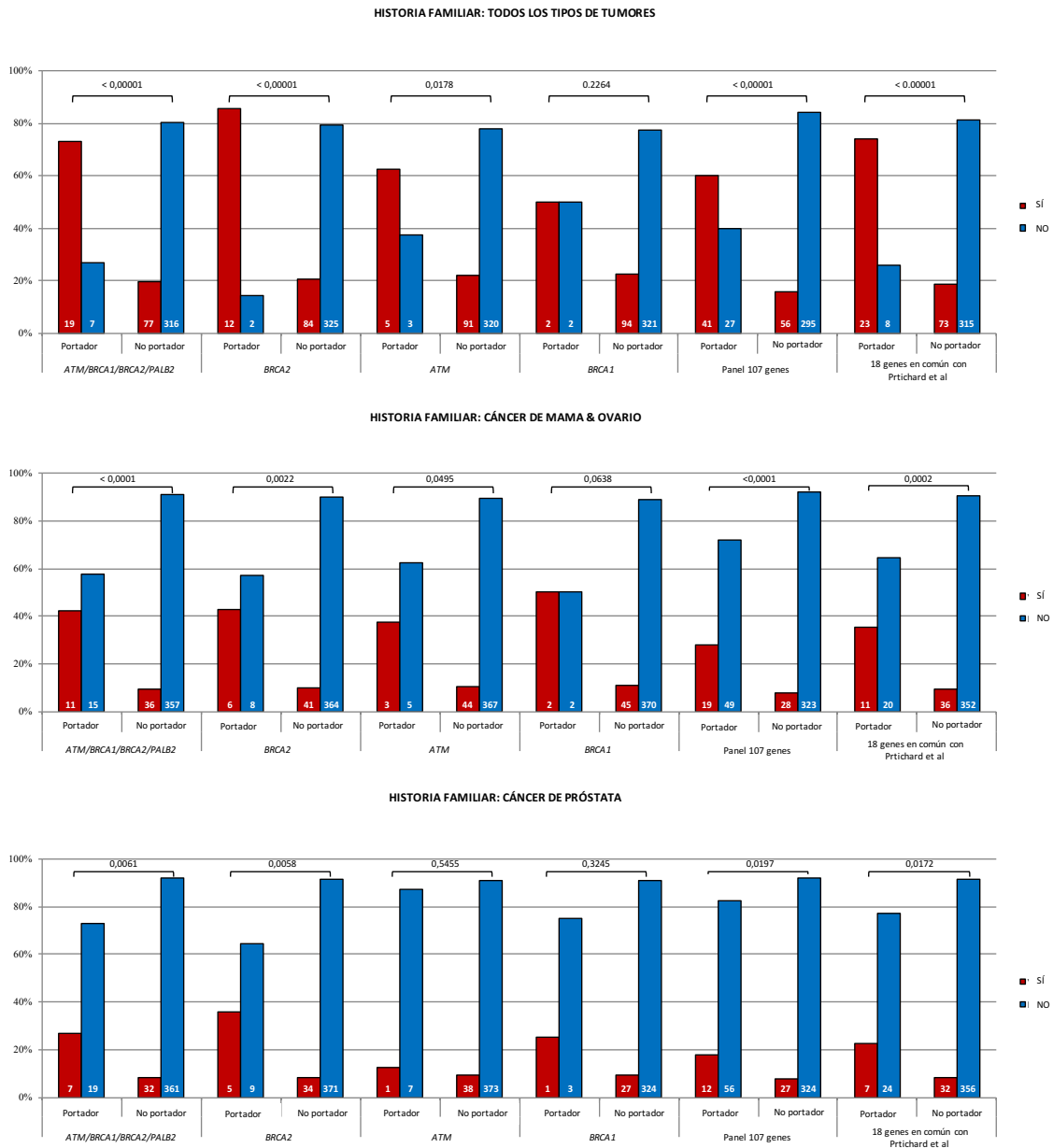


Figura 18: Antecedentes familiares de cáncer en parientes de primer y segundo grado en los grupos de portadores y no portadores. De arriba abajo: pacientes con antecedentes familiares incluyendo todos los tipos de tumores; pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario y pacientes con antecedentes familiares de cáncer de próstata.

Los 18 genes en común con Pritchard et al: *ATM, ATR, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, FAM175A, GEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, XRCC2.*

Algunas guías clínicas recomiendan la realización de cribado genético a todos los pacientes con cáncer de próstata con enfermedad localizada de alto riesgo o metastásica^{41,148}, independientemente de los antecedentes familiares. Aunque realizar un cribado a todos los pacientes permitiría identificar a la gran mayoría de los portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*, la gran cantidad de recursos sanitarios necesarios para llevar a cabo esta estrategia podría resultar poco viable para los sistemas sanitarios en la actualidad. Por lo tanto, la identificación de características clínicas y/o histológicas asociadas a la presencia de estas alteraciones es crucial para optimizar el cribado de los pacientes con cáncer de próstata (relacionado con objetivo 5).

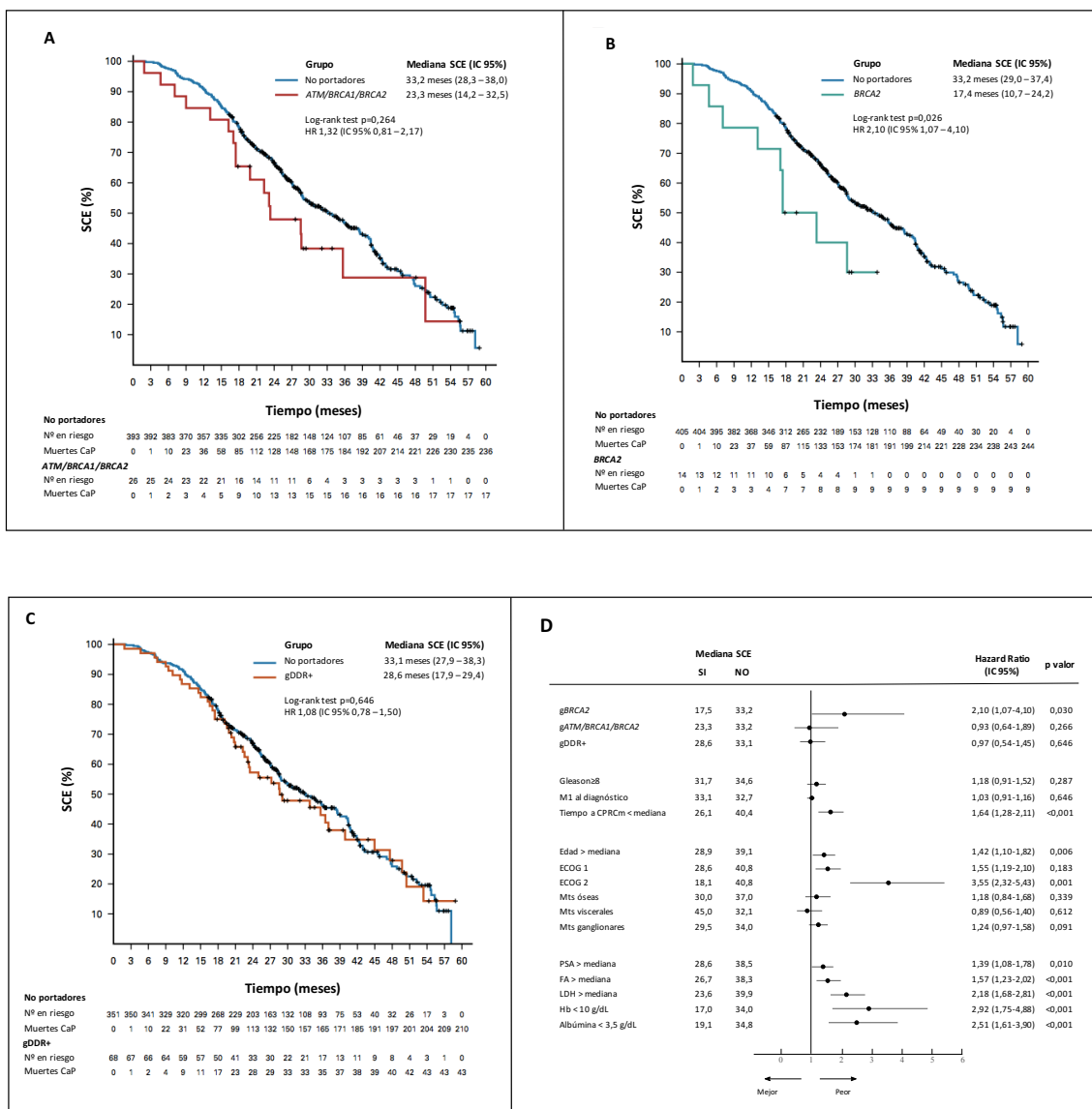
En cuanto a las características clínicas al diagnóstico de CPRCm de los pacientes incluidos en PROREPAIR-B, no se observaron diferencias significativas en la mayoría de las variables analizadas entre portadores y no portadores. Sin embargo, la mediana de tiempo transcurrido desde el inicio de la terapia de deprivación androgénica para enfermedad recurrente o metastásica hasta el desarrollo de resistencia a castración fue significativamente más corto en los portadores de mutaciones en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* que en los no portadores (22,8 vs 28,4 meses; $p=0,007$), siendo particularmente más corta en los pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2* (22,8 vs 13,2 meses; $p=0,048$).

Con una mediana de seguimiento de 39 meses en el momento del corte de datos, la mediana de tratamientos administrados para CPRCm (excluyendo re-tratamientos) fue de 2 (rango 1-5). No se observaron diferencias en cuanto a la exposición de docetaxel, cabazitaxel, abiraterona, enzalutamida o radio-223 entre portadores y no portadores. Cabe destacar que solamente el 7,4% de los portadores y el 5,4% de los no portadores recibieron tratamiento con platinos ($p=0,567$), y que solamente 4 pacientes, todos ellos dentro del grupo de no portadores, recibieron un inhibidor de PARP dentro de un ensayo clínico.

En cuanto a la supervivencia causa-específica, aunque la mediana fue 10 meses más corta en el grupo de portadores de alteraciones en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* en comparación con los no portadores (figura 19; A), esta diferencia no fue estadísticamente significativa (23,3 vs 33,2 meses; $p=0,264$; HR 1,32; IC95% 0,81-2,17), por lo que el estudio no cumplió su objetivo principal. De igual manera, no se observaron diferencias

significativas cuando se analizaron todos los pacientes portadores de mutaciones en alguno de los 107 genes analizados frente a no portadores (28,6 vs 33,1 meses; $p=0,646$; HR 1,08; IC95% 0,78-1,50) (figura 19; C). Por el contrario, en los pacientes con mutaciones germinales en *BRC A2*, se observó una SCE casi la mitad menor en comparación con los no portadores, alcanzando significación estadística (17,4 vs 33,2 meses; $p=0,027$; HR 2,10; IC95% 1,07-4,10) (figura 19; B).

El análisis multivariable (tabla 14), que incluyó todas las variables significativas en el análisis univariable (figura 19; D), identificó las mutaciones germinales en *BRC A2* como factor pronóstico independiente para la SCE desde el diagnóstico de CPCRm (HR 2,11; IC95% 1,06-4,18). La presencia de ECOG 2 (HR 2,52; IC95% 1,07-3,18) y albúmina $<3,5$ g/dL (HR 2,18; IC95% 1,38-3,46) fueron otros de los factores asociados de manera independiente con una SCE más corta.



Abreviaturas: HR – Hazard ratio; IC – Intervalo de Confianza; CaP – Cáncer de Próstata; ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; FA – Fosfatasa Alcalina; LDH – Lactato deshidrogenasa; Hb – Hemoglobina.

Figura 19: Supervivencia causa-específica (SCE) desde el diagnóstico de cáncer de próstata resistente a castración metastásico (CPRCm). Curvas Kaplan-Meier para SCE (A) grupo ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2 frente a no portadores; (B) BRCA2 frente a no portadores; (C) todos los portadores de mutaciones germinales en panel de 107 genes (gDDR+) frente a no portadores. (D) Forest-plot del análisis univariable para SCE.

Tabla 14: Análisis multivariante para supervivencia causa-específica desde diagnóstico de CPRCm

Factores pronósticos en análisis UVA para SCE desde CPRCm	MVA HR (IC 95%)	p-valor
Mutaciones germinales <i>BRCA2</i>		
Portador vs no portador	2,11 (1,06-4,18)	0,033
Mediana tiempo a CPRCm desde DA		
<28 vs ≥28 meses	1,52 (1,17-1,98)	0,018
Mediana edad CPRCm		
≤71,4 vs >71,4 años	1,26 (0,96-1,64)	0,097
ECOG performance status (PS)		
PS 1 vs PS 0	1,29 (0,97-1,72)	0,080
PS 2 vs PS 0	2,52 (1,60-3,97)	<0,001
Mediana PSA en CPRCm		
≤27,5 vs >27,5 ng/dL	1,09 (0,83-1,43)	0,528
Fosfatasa Alcalina		
Elevada (>LSN) vs Normal (≤LSN)	1,16 (0,88-0,284)	0,284
Lactato deshidrogenasa (LDH)		
Elevada (>LSN) vs Normal (≤LSN)	1,85 (1,40-2,44)	<0,001
Hemoglobina		
<10 vs ≥10 g/dL	1,85 (1,07-3,18)	0,027
Albúmina		
<3,5 vs ≥3,5 g/dL	2,18 (1,38-3,46)	0,001

Abreviaturas: UVA – Análisis univariante; SCE – Supervivencia causa-específica; MVA – Análisis multivariante; HR – Hazard ratio; IC – Intervalo de confianza; CPRCm – Cáncer de Próstata Resistente a la castración metastásico; DA – Deprivación androgénica; LSN – Límite superior de la normalidad

En cuanto a los tratamientos recibidos, de forma general, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los objetivos analizados (respuesta por PSA [PSA50], tasa de respuesta global [TRG], tiempo a la progresión por PSA [TPP], supervivencia libre de progresión [SLP] y supervivencia causa-específica [SCE]) entre el grupo de portadores de mutaciones *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* y los no portadores cuando fueron tratados en primera línea con un ARSi o un taxano. Sin embargo, a la hora de comparar a los pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* frente a los no portadores, se observó una mediana en la SCE más corta tras el primer taxano (12,8 vs 23,3 meses; p=0,015; HR 2,23; IC95% 1,13-4,38), pero no tras el primer ARSi (23,2

vs 26,2 meses; $p=0,215$; HR 1,63; IC95% 0,76-3,48). Las diferencias entre estos dos grupos en cuanto a PSA50, TRG, TTP o PFS no fueron estadísticamente significativas. Se llevó a cabo un análisis de interacción para evaluar si el impacto del estado mutacional (portador vs no portador) en la SCE podría estar influido por el tratamiento administrado en primera línea (ARSi vs taxano). Se observó una interacción significativa para la SCE entre el estado de mutaciones germinales en *BRCA2* y el tipo de tratamiento administrado en primera línea, tanto en el modelo de Cox no ajustado ($p=0,015$), como en un modelo ajustado por edad, ECOG, PSA basal, tiempo a la resistencia a castración desde privación androgénica y valores de LDH, FA, albúmina y hemoglobina ($p=0,014$) (figura 20). Este análisis indicaba que aquellos pacientes con mutaciones *gBRCA2* tenían peor SCE cuando eran tratados con un taxano en primera línea de CPRCm en comparación con aquellos pacientes *gBRCA2* tratados con un ARSi en este mismo escenario de primera línea (10,7 vs 24 meses) (figura 20; A). Por el contrario, no se encontraron interacciones significativas para la SCE cuando se analizaron otros grupos de portadores (*ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* o el conjunto total de portadores en el panel de 107 genes) (figura 20; B y C).

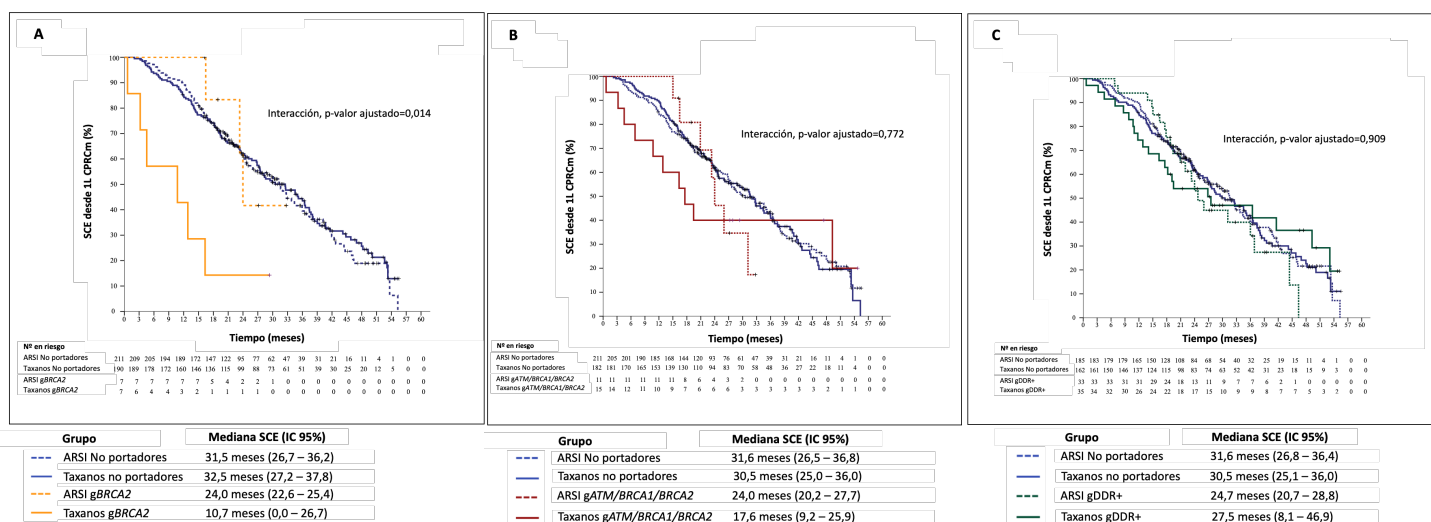


Figura 20: Supervivencia causa-específica (SCE) desde la primera línea para cáncer de próstata resistente a castración metastásico (CPRCm) y a análisis de interacción entre el estado de portador de mutaciones germinales y el tipo de tratamiento recibido. Análisis de Kaplan-Meier en 415 pacientes – 218 tratados con un ARSi y 197 con taxanos (fueron excluidos 4 pacientes tratados con Ra-223 en primera línea) –, separados según los subgrupos de portadores: A) portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* vs no portadores; se observó una interacción positiva entre el estado de portador de *gBRCA2* y el tipo de tratamiento recibido en primera línea

(p valor ajustado=0,014). No se observaron interacciones significativas entre el tipo de tratamiento y los siguientes grupos: B) portadores de mutaciones germinales en *ATM/BRCA1/BRCA2* vs no portadores (valor p ajustado=0,772) y C) portadores de mutaciones en cualquiera de los 107 genes del panel vs no portadores (valor p ajustado=0,909). Los factores incluidos junto al estado de portador en el modelo de regresión de Cox de interacción ajustada fueron los que se asociaron de manera significativa con la SCE: mediana de tiempo hasta el desarrollo de CPRCm desde el inicio de TDA, mediana de PS, ECOG, albúmina, LDH y FA.

Para analizar el impacto de la secuencia de tratamiento en pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*, se llevó a cabo un análisis *post-hoc* con el fin de comparar la SCE y la SLP2 (SLP desde el inicio de la primera línea hasta la progresión a la segunda línea de tratamiento o fallecimiento) según el estado de *gBRCA2* y la secuencia administrada: ARSi-taxano vs taxano-ARSi. Un total de 348 pacientes fueron elegibles para este análisis, 190 para la secuencia ARSi-taxano (entre los cuales había 7 portadores de mutaciones *gBRCA2*) y 158 para la secuencia taxano-ARSi (incluyendo 7 *gBRCA2*). Cabe destacar que los pacientes de la secuencia taxano-ARSi eran más jóvenes ($p<0,001$), con peor ECOG ($p<0,001$), niveles más elevados de PSA ($p=0,007$), de LDH ($p<0,001$) y de FA ($p=0,010$) que los pacientes de la secuencia ARSi-taxano. El análisis de interacción no ajustado fue significativo tanto para SCE ($p=0,020$) como para SLP2 ($p=0,001$). En pacientes tratados con la secuencia ARSi-taxano, la SCE y la SLP2 no fueron diferentes entre portadores *gBRCA2* y no portadores. Por el contrario, los pacientes *gBRCA2* tratados con la secuencia taxano-ARSi presentaron una SCE (28,4 vs 10,7 meses; $p<0,001$; HR 4,16; IC95% 1,80-9,62) y una SLP2 (17,1 vs 8,6 meses; $p<0,001$; HR 8,16; IC95% 3,60-18,49) significativamente más cortas que los no portadores tratados con la misma secuencia. En el modelo ajustado por las variables pronósticas se observó igualmente una interacción significativa para SCE (valor p modelo ajustado=0,015) y SLP2 (valor p modelo ajustado=0,005). En el grupo de no portadores, la CSE y la SLP2 fueron similares para ambas secuencias de tratamiento.

Como se ha comentado en la introducción, sección 7.3.2, las implicaciones clínicas que tienen las alteraciones en genes de la reparación del ADN en pacientes con CPRCm tratados con terapias convencionales no son concluyentes, ya que los estudios publicados han arrojado información en cierta medida contradictoria. En PROREPAIR-

B se ha observado una interacción que sugiere que el impacto de las mutaciones germinales en *BRCA2* en la supervivencia causa-específica y la SLP2 puede verse modificado por el tipo de tratamiento recibido, así como por la secuencia del mismo. Esto, en cierta medida, podría explicar los resultados contradictorios previamente publicados. En el estudio de Annala *et al*¹⁵⁵, en el que se incluyeron de forma retrospectiva 176 pacientes con CPRCm, 22 de los cuales eran portadores de mutaciones germinales en genes de la reparación del ADN (16 *gBRCA2*), la SLP de los portadores tratados con el primer ARSi fue más corta que la de los no portadores (3,3 vs 6,2 meses, $p=0,01$). Sin embargo, una mayor proporción de pacientes portadores de alteraciones en genes de la reparación del ADN recibieron un ARSi tras un taxano (45% vs 33% en no portadores), secuencia que según nuestros resultados podría tener un impacto negativo en los *gBRCA2*, pero no en los pacientes no portadores de mutaciones germinales. Además, en este estudio se observó una alta heterogeneidad en las respuestas, con SLP superiores a 2 años en algunos portadores tratados con ARSi. En nuestra serie, también se identificaron respuestas prolongadas a los ARSi entre el grupo de portadores, incluyendo tres portadores *gBRCA2* que respondieron durante más de 12 meses (uno de ellos se benefició de enzalutamida durante 32 meses). Estas observaciones coinciden con la publicación de Antonarakis *et al*¹⁵⁶, en la cual se incluyeron de forma retrospectiva 172 pacientes con CPRCm tratados con ARSi, entre los cuales había 22 portadores de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN (5 *gBRCA2*). En este caso, solamente el 23% de los pacientes, tanto portadores como no portadores, recibieron quimioterapia antes de recibir un ARSi. A diferencia del estudio de Annala *et al*, en este análisis se observó una tendencia hacia una SLP más prolongada en los portadores de mutaciones germinales en *ATM/BRCA1/BRCA2* (15 vs 10,8 meses, $p=0,90$) en comparación con los no portadores al ser tratados con un ARSi. Cabe destacar que en este análisis también se identificó la administración de quimioterapia previa como un factor asociado a peor SLP y SCE, pero no analizaron si esto afectaba de forma similar a portadores y no portadores. Finalmente, en la serie retrospectiva publicada por Mateo *et al*¹⁵⁷, con 330 pacientes no portadores y 60 portadores de mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN (37 *gBRCA2*), no se encontraron diferencias entre ambos grupos con respecto a la respuesta al primer taxano o ARSi. Sin embargo, no se especificó cuál era la secuencia de tratamiento. En este caso, no se observaron diferencias en la SCE entre portadores y no portadores (38,4 vs 36,0 meses, $p=0,73$), ni siquiera en el subgrupo de pacientes *gBRCA2*,

pero hay que destacar que el 47% de los portadores recibieron un inhibidor de PARP y/o un platino, lo cual pudo suponer un efecto de confusión en la supervivencia.

Se deben reconocer algunas limitaciones del presente estudio. En primer lugar, la prevalencia de las mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN observadas en nuestra serie no puede extrapolarse a otras cohortes debido a la variabilidad en la prevalencia de estas alteraciones germinales entre diferentes poblaciones. Son necesarios estudios más amplios para establecer la verdadera frecuencia de mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en CPRCm. En segundo lugar, el análisis del pronóstico de los pacientes según el tipo y la secuencia de tratamiento está limitada por la falta de aleatorización inherente a un estudio observacional. Debido al pequeño número de portadores de este subanálisis, los hallazgos sobre el impacto de la secuencia de tratamiento en *gBRCA2* deben ser validados en series más amplias. En tercer lugar, no se han tenido en cuenta las alteraciones somáticas que podrían estar presentes en una elevada proporción de pacientes (tanto portadores como no portadores).

2 Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline *BRCA2* mutation carriers.

Relacionado con los objetivos 3 y 4

3. Analizar la prevalencia de alteraciones somáticas en *BRCA2*, *RBI*, *MYC* y *PTEN* en pacientes con cáncer de próstata portadores y no portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*.

4. Explorar el impacto clínico de las alteraciones somáticas frecuentemente asociadas a la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2* está asociada con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata, como se detalla en la introducción, sección 7.3. El racional biológico de este comportamiento agresivo no está totalmente dilucidado, aunque podría estar relacionado con la presencia de determinados eventos somáticos asociados a la inestabilidad genómica que presentan los tumores *gBRCA2*. Resultados previos han demostrado que los tumores de pacientes *gBRCA2* están enriquecidos en eventos somáticos como la delección de *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* o la amplificación de *MYC*^{119,128,224}. Sin embargo, hasta el momento, se desconoce el impacto que puede suponer la presencia de otras mutaciones somáticas concurrentes en la supervivencia de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*.

PROREPAIR-A es un estudio observacional multicéntrico en el cual han participado 12 centros a nivel internacional (España, Australia y Reino Unido). Se incluyeron pacientes con cáncer de próstata, tanto localizado como avanzado, con confirmación histológica y estado de mutación germinal para genes relacionados con la reparación del ADN previamente testado y conocido. La disponibilidad de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina y la información sobre las características clínico-patológicas al diagnóstico fueron requisitos de elegibilidad. Cada caso portador de mutación germinal en *BRCA2* fue inicialmente emparejado con 2 controles esporádicos (no portadores de alteraciones en genes relacionados con la reparación del

ADN) en base al grupo de Gleason y la presencia/ausencia de enfermedad metastásica al diagnóstico.

El objetivo principal del estudio fue confirmar el valor pronóstico negativo de las mutaciones germinales en *BRCA2* para la supervivencia causa-específica en pacientes con cáncer de próstata. Los objetivos secundarios fueron establecer la asociación entre mutaciones germinales en *BRCA2* y las variaciones en el número de copias (CNV, *copy number variation*) en los genes *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* y *MYC*, así como analizar el impacto de estas alteraciones somáticas en la supervivencia causa-específica, la supervivencia libre de metástasis y el tiempo a la resistencia a castración en pacientes *gBRCA2* versus no portadores.

La determinación somática de *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* y *MYC* se realizó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescence in situ hybridization*). Se llevó a cabo una comparación de las alteraciones detectadas mediante FISH con NGS (*next generation sequencing*) en aquellas muestras con adecuada calidad de ADN para realizar WES (*whole-exome sequencing*) y el panel de *UW-OncoPlex*²²⁵.

Dos patólogos expertos y no conocedores del grupo de casos y controles (“ciegos” para la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*) analizaron en aquellos tumores con tejido viable (n=151) la presencia de patrones intraductal y/o cribiforme.

NOTA: La metodología empleada se explica de forma más detallada en el apartado de material y métodos.

Se incluyeron un total de 200 pacientes (73 *gBRCA2* y 127 no portadores), de los cuales 24,8% eran metastásicos al diagnóstico (28,8% de los portadores y 22% de los no portadores; p=0,287). En cuanto al resto de características basales, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, salvo en la edad y el estadio local. Los pacientes portadores eran ligeramente más jóvenes al diagnóstico que los no portadores (62,6 vs 64,5 años, p=0,028); y presentaron tumores localmente avanzados (T3/T4) con mayor frecuencia (31,5% vs 9,4%, p<0,001).

Los tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* presentaron un mayor porcentaje de eventos somáticos en comparación con los no portadores. La pérdida de *BRCA2* detectada mediante FISH estaba presente en un 42,5% vs 11,8% ($p < 0,001$) en *gBRCA2* y en no portadores, respectivamente. Las deleciones de *RBI* (54,8% vs 21,3%, $p < 0,001$) y la amplificación de *MYC* (53,4% vs 18,8%, $p < 0,001$) fueron también más frecuentes en *gBRCA2* en comparación con no portadores (Tabla 15). La pérdida de *BRCA2* y *RBI* de forma conjunta fue muy frecuente en ambos grupos de pacientes. En 49 de 51 tumores con pérdida somática de *BRCA2* se observó pérdida concurrente de *RBI*, con una correlación fuerte ($p = 0,001$), con un índice Kappa de concordancia de 0,74. La co-delección de *BRCA2-RBI* fue más frecuente también en *gBRCA2* que en no portadores (41,1% vs 11,8%, $p < 0,001$).

Los genes *BRCA2* y *RBI* se encuentran localizados en el mismo brazo del cromosoma 13q, con una proximidad muy cercana (separados por 16 Mb). Por consiguiente, es común observar la delección simultánea de ambos genes en cáncer de próstata^{121,226}.

Nuestro estudio confirma que los tumores asociados a mutaciones germinales en *BRCA2* presentan un enriquecimiento de eventos somáticos, como la delección de *BRCA2*, la delección de *RBI*, la co-pérdida de *BRCA2-RBI* o la amplificación de *MYC*. Esto sugiere que los tumores asociados a mutaciones *gBRCA2* presentan un genotipo tumoral más agresivo.

Se analizó la presencia de los patrones IDC y/o CRIB en 151 tumores (52 *gBRCA2* y 99 no portadores). La morfología IDC y/o CRIB estaba presente en una proporción similar de pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* y no portadores (57,7% vs 56,6%, respectivamente). La presencia de IDC se asoció de forma más frecuente con la pérdida somática de *PTEN*, mientras que el patrón CRIB se asoció de forma significativa con la co-delección *BRCA2-RBI* y la amplificación de *MYC*. La histología IDC y/o CRIB se encontró con mayor frecuencia en tumores con la co-delección *BRCA2-RBI* (67,7% vs 41,9%, $p = 0,008$).

Tabla 15: Características moleculares del análisis somático mediante FISH

	No Portadores (N=127)	<i>gBRCA2</i> (N=73)	P valor
Deleción somática <i>BRCA2</i> (FISH)			
No alteración	112 (88,2%)	40 (54,8%)	
Deleción <i>BRCA2</i>	15 (11,8%)	31 (42,5%)	
<i>Heterocigota</i>	13 (10,2%)	29 (39,7%)	
<i>Homocigota</i>	2 (1,6%)	2 (2,7%)	
Indeterminada	0	2 (2,7%)	< 0,001
Deleción somática <i>RBI</i> (FISH)			
No alteración	100 (78,7%)	33 (45,2%)	
Deleción <i>RBI</i>	27 (21,3%)	40 (54,8%)	
<i>Heterocigota</i>	18 (14,2%)	36 (49,3%)	
<i>Homocigota</i>	9 (7,1%)	4 (5,5%)	< 0,001
Co-deleción <i>BRCA1-RBI</i> (FISH)			
No	100 (78,7%)	32 (43,8%)	
Deleción <i>BRCA2</i>	0	1 (1,4%)	
Deleción <i>RBI</i>	12 (9,4%)	8 /11,0%	
Co-deleción <i>BRCA2-RBI</i>	15 (11,8%)	30 (41,1%)	
Indeterminada	0	2 (2,7%)	< 0,001
<i>MYC</i> (FISH)			
No alteración	103 (81,1%)	32 (43,9%)	
Amplificación <i>MYC</i>	12 (9,4%)	35 (47,9%)	
Ganancia <i>MYC</i>	12 (9,4%)	4 (5,5%)	
Indeterminada	0	2 (2,7%)	0,213
<i>PTEN</i> (FISH)			
No alteración o deleción heterocigota	93 (73,2%)	46 (63,1%)	
Deleción <i>PTEN</i> homocigota	34 (26,8%)	25 (34,2%)	
Indeterminada	0	2 (2,7%)	
Características histológicas (n=151)	(N=99)	(N=52)	
Intraductal	45 (45,5%)	21 (40,4%)	0,550
Cribiforme	44 (44,4%)	28 (53,8%)	0,272
Intraductal y/o cribiforme	56 (56,6%)	30 (57,7%)	0,894

Abreviaturas: *gBRCA2* – Portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*.

Por otra parte, los tumores de los pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico (tanto en el grupo de portadores como de no portadores) estaban enriquecidos en la presencia de la co-delección *BRCA2-RB1* (34% vs 21%, $p < 0,01$) y amplificación de *MYC* (42% vs 16%, $p < 0,001$) en comparación con los tumores de pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico (figura 21).

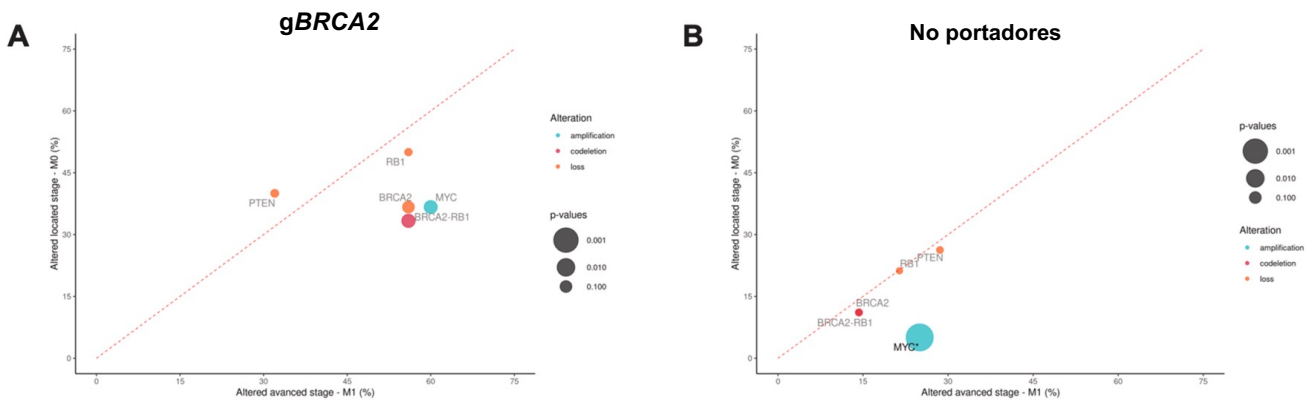


Figura 21: Frecuencia de los eventos genómicos somáticos en función del estadio al diagnóstico (metastásico vs no metastásico) en A) portadores de mutaciones germinales en BRCA2 y B) no portadores.

Se analizó la concordancia entre las alteraciones detectadas mediante FISH y NGS en un subgrupo de 30 tumores mediante el índice de concordancia Kappa. Los valores ponderados de Kappa oscilaron entre una concordancia moderada y muy buena para los genes explorados: 0,801 (IC95% 0,58-1,0) para la delección somática de *BRCA2*; 0,708 (IC95% 0,48-0,93) para la delección de *RBI*; 0,644 (IC95% 0,48-0,90) para la delección de *PTEN* y 0,627 (IC95% 0,35-0,90) para la amplificación de *MYC*.

Las nuevas técnicas de secuenciación (NGS) aportan una gran cantidad de información y están reemplazando en gran medida a otras técnicas más clásicas a la hora de realizar análisis genómicos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que existe un porcentaje de fallo en el análisis de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) que oscila entre el 30-50% en cáncer de próstata²²⁷. Del mismo modo, la determinación del número de copias es compleja en muestras de plasma con fracciones bajas de ADN tumoral circulante²²⁸.

Antes de la llegada de la NGS, la hibridación *in situ* fluorescente era ampliamente utilizada para evaluar las variaciones en el número de copias (CNV), y se consideraba el método de elección para validar el CNV en los primeros análisis de secuenciación (NGS)²²⁹. En nuestro estudio, hemos logrado analizar el CNV de forma satisfactoria en el 94% de las muestras mediante FISH.

La concordancia entre las técnicas de FISH y NGS puede verse afectada por diferentes parámetros, como la profundidad de lectura en la secuenciación, entre otros. En nuestro estudio comparamos los resultados entre FISH y NGS en un subconjunto de muestras (n=30), encontrando una fuerte concordancia entre ambos métodos en la detección de deleciones en *BRCA2* y la co-delección *BRCA2-RB1*. Aunque estos resultados requieren análisis adicionales, la hibridación *in situ* fluorescente sigue siendo el *gold standard* para la detección de las variaciones en el número de copias, ya que permite una evaluación citogenética directa. En contraste, la NGS se basa en una estimación inferida mediante métodos matemáticos a partir de la comparación de la densidad de las lecturas en las distintas regiones secuenciadas. Se debe tener en cuenta, además, que la hibridación *in situ* fluorescente es una técnica sencilla, rápida y de bajo coste.

Tras una mediana de seguimiento de 12 años, y considerando el conjunto total de pacientes incluidos (metastásicos y no metastásicos), la mediana de la supervivencia causa-específica fue de 9,1 años para los pacientes *gBRCA2* frente a 17,6 años para los no portadores (HR 2,12; p=0,002) (figura 22; A). Cuando el análisis se limitó solamente a los pacientes M0, se mantuvo la diferencia estadísticamente significativa (11,3 años vs mediana no alcanzada, HR 3,71; p<0,001) (figura 22; B). De igual manera, la supervivencia libre de metástasis y el tiempo a la resistencia a castración fueron inferiores en el grupo de portadores *gBRCA2* en comparación con los no portadores (SLM: 8,6 años vs mediana no alcanzada, HR 3.94; p<0,001; TRC: 8,8 años vs mediana no alcanzada; HR 1,88; p=0,005) (figura 22; C y D).

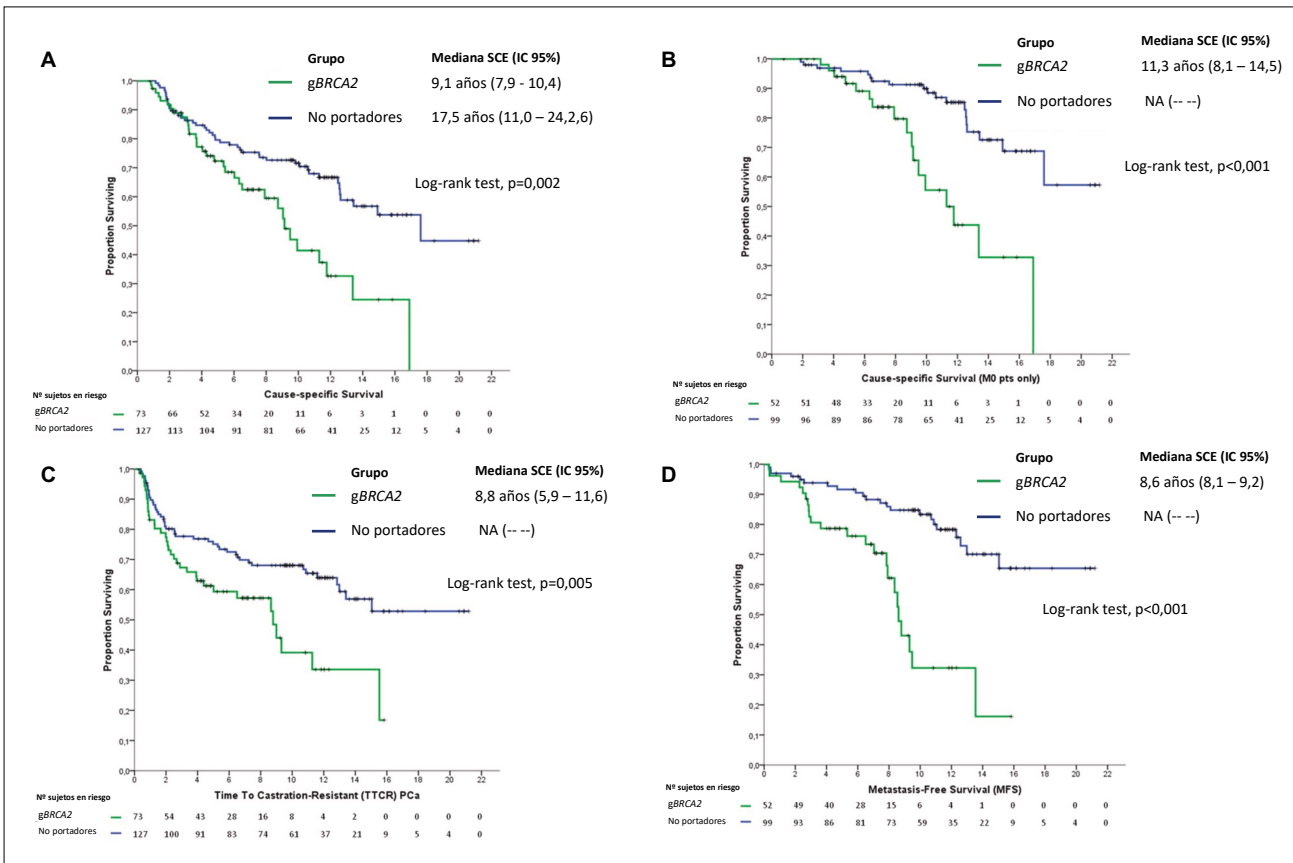


Figura 22: Supervivencia causa-específica (SCE), supervivencia libre de metástasis (SLM) y tiempo a la resistencia a castración (TRC) desde el diagnóstico de cáncer de próstata. Curvas Kaplan-Meier en el grupo de pacientes gBRCA2 vs no portadores para A) SCE; B) SCE en pacientes no metastásicos; C) TRC y D) SLM.

La pérdida somática de *BRCA2*, de *RBI*, la co-delección *BRCA2-RBI*, y la amplificación de *MYC* determinadas mediante FISH se asociaron de forma significativa con una menor SCE y TRC en el análisis univariante (tanto en pacientes portadores como no portadores de mutaciones gBRCA2). La pérdida de *PTEN* se correlacionó con una menor SCE, TRC y SLM en el grupo de pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico.

De igual forma, se encontró una asociación significativa entre los patrones IDC y/o CRIB y un peor pronóstico.

El análisis del objetivo principal del estudio y el posterior análisis multivariable (Tabla 16) confirmaron que las mutaciones germinales en *BRCA2* son un factor pronóstico independiente para la supervivencia causa-específica (MVA HR 3,92; p=0,009). Otros factores asociados de forma independiente con una menor SCE fueron la

co-delección de *BRCA2-RBI* (HR 4,0; p=0,009), la amplificación de *MYC* (HR 2,57; p=0,037), la enfermedad metastásica al diagnóstico (HR 12,37; p<0,001) y el grupo de Gleason ≥ 4 (HR 6,0; p<0,001). La presencia de patrón cribiforme o intraductal no se asoció con una SCE más corta en el modelo multivariable.

En cuanto al tiempo hasta la resistencia a castración, los factores asociados de forma independiente con un TRC más corto fueron las mutaciones *gBRCA2* (HR 3,73, p=0,011), la co-delección *BRCA2-RBI* (HR 2,92; p=0,048), el grupo de Gleason ≥ 4 (HR 4,51; p=0,002); mayores niveles de PSA al diagnóstico (HR 2,72, p=0,021) y el estadio metastásico al diagnóstico (HR 9,38; p<0,001).

En la población no metastásica, los factores asociados de forma independiente con una menor supervivencia libre de metástasis fueron las mutaciones *gBRCA2* (HR 5,56; p<0,008); la co-delección de *BRCA2-RBI* (HR 5,99; p=0,007), el grupo de Gleason ≥ 4 (HR 5,96; p<0,001), los tumores T3/T4 (HR 3,0; p=0,008), la presencia de N1 (HR 2,63; p=0,029) y el patrón cribiforme (HR 3,78; p=0,028).

PROREPAIR-A respalda, por tanto, los hallazgos de estudios previos al confirmar el valor pronóstico negativo e independiente de las mutaciones germinales en *BRCA2* para la supervivencia causa-específica, el tiempo hasta la resistencia a la castración y la supervivencia libre de metástasis en pacientes con cáncer de próstata.

Tabla 16: Análisis multivariable para la supervivencia causa-específica, tiempo a la resistencia a castración y supervivencia libre de metástasis.

Variable en el MVA	SCE		TRC		SLM*	
	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)	p valor
Mutaciones germinales <i>BRCA</i> g <i>BRCA2</i> vs no portador	3,92 (1,40-10,93)	0,009	3,73 (1,29-10,77)	0,015	5,56 (1,57-19,75)	0,008
<i>RBI</i> Pérdida <i>RBI</i> vs No	0,91 (0,18-4,58)	0,914	0,77 (0,16-3,89)	0,758	0,45 (0,05-3,96)	0,470
Co-pérdida <i>BRCA2-RBI</i> Co-pérdida <i>BRCA2-RBI</i> vs No	4,01 (1,42-11,34)	0,009	2,92 (1,01-8,45)	0,049	5,99 (1,63-22,08)	0,007
<i>MYC</i> Amplificación <i>MYC</i> vs No Ganancia <i>MYC</i> vs No	2,57 (1,06-6,25) 1,82 (0,59-5,66)	0,037 0,299	2,21 (0,85-5,73) 2,21 (0,73-6,73)	0,102 0,162	1,91 (0,61-5,95) 1,95 (0,48-7,87)	0,263 0,351
<i>PTEN</i> Delección homocigota <i>PTEN</i> vs no	1,03 (0,51-2,07)	0,930	1,07 (0,51-2,23)	0,858	1,95 (0,48-2,72)	0,769
Edad al diagnóstico >65 vs ≤65 años	0,87 (0,45-1,68)	0,684	0,99 (0,95-1,03)	0,642	0,58 (0,12-2,87)	0,506
PSA al diagnóstico Superior vs inferior a la mediana	1,46 (0,65-3,26)	0,355	2,72 (1,16-6,35)	0,021	2,19 (0,85-5,65)	0,103
Gleason Score Grupo ≥4 vs ≤3	6,00 (2,21-16,27)	<0,001	4,51 (1,72-11,83)	0,002	5,96 (2,34-15,17)	<0,001
N1 al diagnóstico Sí vs No	0,96 (0,30-3,10)	0,952	0,84 (0,25-2,75)	0,767	2,63 (1,11-6,26)	0,029
Estadio local (T) T3/T4 vs T1/T2	0,99 (0,44-2,22)	0,977	1,00 (1,44-2,25)	0,994	3,01 (1,33-6,82)	0,008
M1 al diagnóstico Sí vs No	12,3 (4,06-37,67)	<0,001	9,38 (3,31-26,57)	<0,001	--	--

2 pacientes excluidos del análisis multivariable por falta de datos (n=198)

*En pacientes no metastásicos (n=151)

Dado que la co-delección de *BRCA2-RBI* y la amplificación de *MYC* estaban asociadas a una menor SCE, se llevó a cabo un análisis para valorar el impacto clínico que podían tener estos eventos somáticos en los pacientes portadores de g*BRCA2*. En los pacientes con mutaciones germinales en *BRCA2*, la presencia de la co-delección somática de *BRCA2-RBI* (6,3 vs 11,3 años, p=0,041) o la amplificación de *MYC* (6,0 vs 13,4 años, p<0,001) se asociaron con una menor supervivencia causa-específica (figura 23; A y B). De igual manera, en pacientes no portadores, la pérdida conjunta de *BRCA2-RBI* (8 años vs mediana no alcanzada, p<0,001) y la amplificación de *MYC* (2,6 años vs mediana no alcanzada, p<0,001) estaban asociadas de forma significativa a una SCE más corta (figura 23; C y D).

Previamente, se ha observado en modelos preclínicos que la co-delección somática de *BRCA2-RB1* está asociada a una mayor inestabilidad genómica²³⁰. PROREPAIR-A, ha demostrado, por primera vez, que la co-pérdida somática de *BRCA2-RB1* tiene un impacto clínico negativo, ya que se correlaciona con una menor supervivencia causa-específica, una menor supervivencia libre de metástasis y un tiempo hasta la resistencia a la castración más corto. Además, la presencia o ausencia de estos eventos a nivel somático modifica el pronóstico de los portadores de mutaciones *gBRCA2*. En nuestro estudio, la mediana de SCE de los pacientes con mutaciones *gBRCA2* es de 9,1 años, mientras que en aquellos pacientes que no presentan co-delección somática *BRCA2-RB1* o amplificación de *MYC*, las medianas de SCE son más prolongadas, de 11,3 y 13,4 años, respectivamente. De igual manera, la mediana de SCE en no portadores es de 17,6 años, pero se vacorta significativamente en aquellos pacientes que presentan la co-delección *BRCA2-RB1* (8 años) o amplificación de *MYC* (2,6 años). Es importante destacar, a la hora de interpretar estos resultados, que tanto la amplificación de *MYC* como la co-delección de *BRCA2-RB1* fueron vénetos mucho más frecuentes en pacientes con enfermedad metastásica *de novo* (figura 21).

En cuanto a las limitaciones de nuestro estudio, es importante mencionar que no se han analizado otras alteraciones en los genes implicados que podrían resultar en una pérdida de función. Además, sería necesario evaluar la inestabilidad genómica global para un análisis más preciso de las correlaciones entre los diferentes eventos genómicos. Se requieren más estudios para comprender cómo otros eventos tumorales, como las mutaciones en *TP53*²³¹ o los patrones de metilación¹²⁸, pueden afectar al pronóstico de los portadores de mutaciones germinales *BRCA2*.

En conclusión, los tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* presentan un mayor porcentaje de alteraciones somáticas, como la co-delección somática de *BRCA2-RB1* y la amplificación de *MYC*, lo cual implica un comportamiento clínico más agresivo. La presencia o ausencia de estas alteraciones somáticas modifica el pronóstico tanto de los pacientes portadores *gBRCA2* como de los no portadores. Por tanto, es crucial integrar el análisis germinal y somático para determinar el pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata.

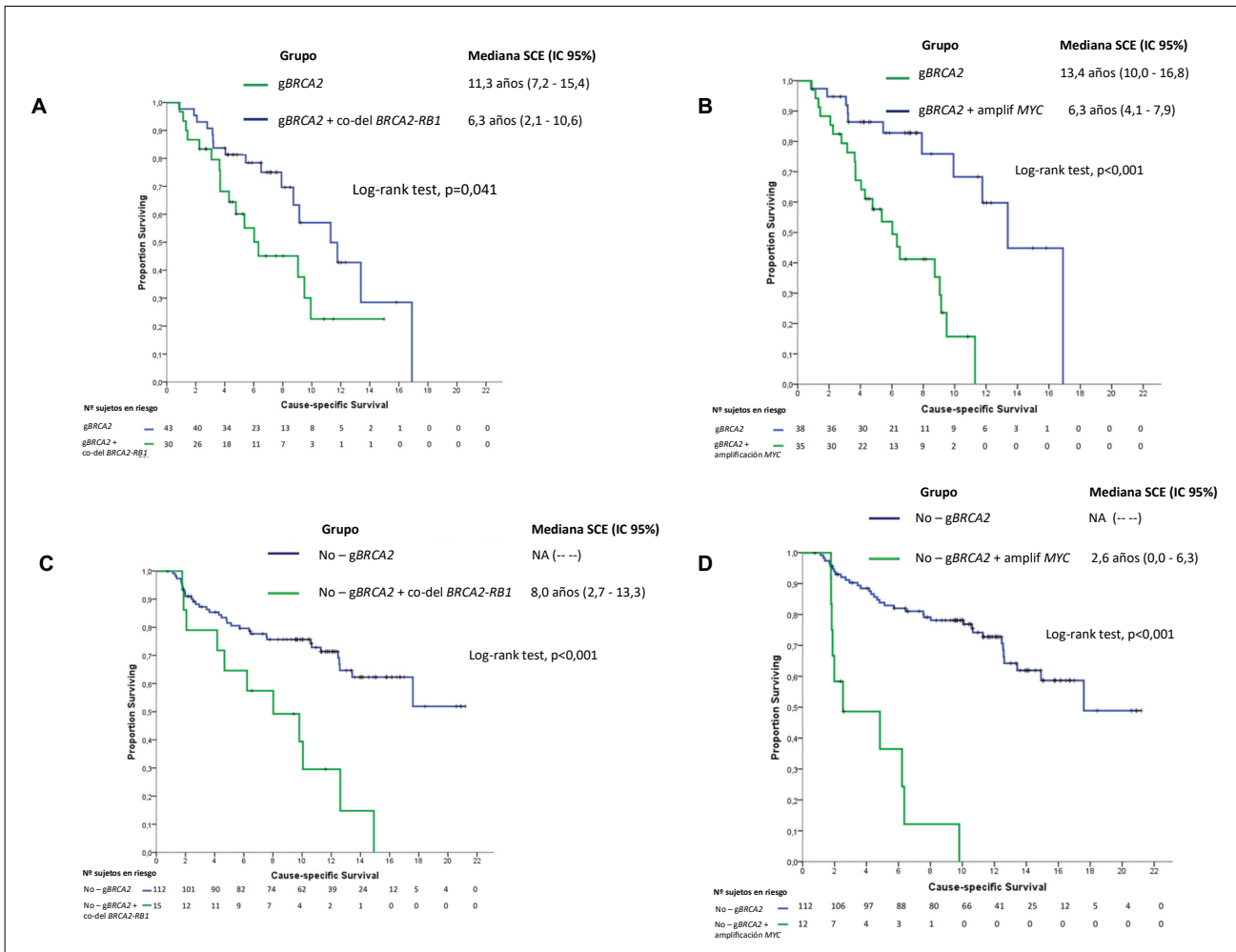


Figura 23: Supervivencia causa-específica (SCE) desde el diagnóstico de cáncer de próstata en pacientes portadores gBRCA2 y no portadores en función de la co-delección somática BRCA2-RB1 y amplificación de MYC. Curvas de Kaplan-Meier para la SCE en A) gBRCA2 con y sin co-delección somática BRCA2-RB1; B) gBRCA2 con y sin amplificación de MYC; C) no portadores con y sin co-delección somática BRCA2-RB1 y D) no portadores con y sin amplificación de MYC.

3 Association between *BRCA2* alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer.

Relacionado con el objetivo 5

5. Describir las características histopatológicas asociadas a la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2*.

La identificación de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* es relevante no solamente para el manejo terapéutico, sino también para la prevención y el diagnóstico precoz de tumores en familiares que puedan heredar la mutación y, en consecuencia, presentar mayor riesgo de desarrollar cáncer. Aunque la realización de pruebas genéticas de forma universal identificaría a la gran mayoría de portadores de mutaciones *gBRCA2*, los recursos necesarios para ello hacen que sea un enfoque inviable para los sistemas sanitarios. Por lo tanto, es necesario identificar características histológicas o clínicas asociadas a *gBRCA2* para optimizar los algoritmos de análisis en línea germinal.

Los patrones histológicos intraductal (IDC) y cribriforme (CRIB) se han asociado con la presencia de mutaciones *gBRCA2* en series retrospectivas de pocos pacientes³⁸⁻⁴⁰, lo cual ha llevado a la recomendación de realizar análisis genético germinal en todos los pacientes con patrón IDC o CRIB^{41,148}, independientemente de la historia familiar de cáncer. Por ello, y para ampliar la evidencia al respecto, se ha llevado a cabo un estudio prospectivo de casos y controles en el cual se incluyeron pacientes previamente testados para mutaciones germinales en *BRCA2*. Los casos fueron pacientes con presencia de mutaciones germinales en *BRCA2* incluidos en el estudio PROREPAIR-A. Estos casos fueron emparejados en una proporción 2:1 con “controles” (no portadores) en base al grupo de Gleason (grupo Gleason ≤ 3 vs grupo Gleason ≥ 4) y el tipo de tejido tumoral (prostatectomía vs biopsia). Los controles procedían de los estudios PROREPAIR-B y PROREPAIR-C, en los cuales se incluyeron pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración y cáncer de próstata localizado, respectivamente. Los controles, como se ha

comentado previamente, debían ser pacientes sin alteraciones germinales en *BRCA2* u otros genes relacionados con la reparación del ADN.

El objetivo principal del estudio fue analizar la asociación entre *gBRCA2* y la presencia de patrones histológicos de IDC y/o CRIB. La presencia de estos dos patrones fue evaluada por dos patólogos expertos “ciegos” para los “casos” y los “controles”. Se llevaron a cabo análisis moleculares mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), secuenciación de nueva generación (NGS) e hibridación genómica comparativa (CGHa) para analizar alteraciones somáticas en *BRCA2*, pérdidas de *PTEN* o fusiones de *TMPRSS2-ERG*.

NOTA: La metodología empleada se explica de forma más detallada en el apartado de material y métodos.

Se incluyeron un total de 174 tumores primarios de próstata, de los cuales, 58 eran portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* (casos) y 116 no portadores (controles). La gran mayoría de los tumores analizados fueron prostatectomías radicales (78%) y el 51,7% de las muestras pertenecían al grupo 4 de Gleason (factores de emparejamiento). Los pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* eran ligeramente más jóvenes al diagnóstico que los no portadores (61,3 vs 63,9 años, $p=0,004$). Los tumores localmente avanzados (T3/T4) fueron más frecuentes en los *gBRCA2* en comparación con los no portadores (31% vs 10,3%, $p<0,001$). La presencia de metástasis ganglionares (12,1% vs 4,3%, $p=0,057$) y a distancia (24,1% vs 16,4%, $p=0,218$) en el momento del diagnóstico fueron más frecuentes en los *gBRCA2*, pero sin alcanzar la significación estadística. No se observaron otras diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tabla 17).

Tras la revisión histopatológica independiente, no se encontraron asociaciones significativas entre las mutaciones *gBRCA2* y la presencia de patrones IDC o CRIB (tabla 17). La morfología IDC se identificó en un 36,2% de los casos *gBRCA2* y en un 50% de los controles ($p=0,085$), mientras que la presencia de patrón CRIB se observó en el 53,4% y el 43,1% de los casos y controles, respectivamente ($p=0,197$). Cuando se analizaron de forma conjunta, la morfología IDC y/o CRIB se documentó en un 56,6% de los portadores frente a un 62,1% de los no portadores ($p=0,660$).

Debido a que previamente se había asociado la presencia de $\geq 30\%$ de patrón IDC/CRIB con una mayor inestabilidad genómica²⁹, se exploró el valor de diferentes porcentajes de IDC/CRIB como puntos de corte para predecir la presencia de mutaciones g*BRCA2*. El área bajo la curva ROC (AUC) resultante fue de 52,4% (IC95% 43,0%-61,9%; p=0,604).

Algunas publicaciones han sugerido una correlación controvertida entre la ubicación de las mutaciones germinales en *BRCA2* y el fenotipo en los tumores de mama y ovario²³². Sin embargo, en nuestra serie no hemos identificado ninguna asociación entre el tipo de mutación (*nonsense*, *frameshift*, *missense*) o su posición en el gen *BRCA2* y la presencia de IDC o CRIB. Es importante destacar que ninguno de los tres tumores portadores de la variante patogénica missense c.8167G>C (p.D2723H) presentaba patrones IDC, CRIB o pérdida somática de *BRCA2*.

Tabla 17: Características de los pacientes y tumores

	<i>gBRCA2</i> n=58	No portadores N=116	P valor
Edad al diagnóstico			
Mediana, años (rango)	61,3 (43,9-77,3)	63,9 (44,7-82,7)	0,004
PSA al diagnóstico			
Mediana, ng/mL (rango)	12,1 (1,5-198)	9,3 (0,5-3380)	0,236
Grupo Grado de Gleason*			
1/2/3	9 (48,3%)	56 (48,3%)	1
≥4	30 (51,7%)	60 (51,7%)	
Estadio local (T)			
T1	3 (5,2%)	28 (24,1%)	<0,001
T2	37 (63,8%)	74 (63,8%)	
T3	16 (27,6%)	12 (10,3%)	
T4	2 (3,4%)	0	
Desconocido	0	2 (1,7%)	
Afectación ganglionar			
N0	51(87,9%)	111(95,7%)	0,057
N1	7 (12,1%)	5 (4,3%)	
Metástasis al diagnóstico			
M0	44 (75,9%)	97 (83,6%)	0,218
M1	14 (24,1%)	19 (16,4%)	
Tipo de tejido tumoral*			
Biopsia	13 (22,4%)	26 (22,4%)	1
Prostatectomía radical	45 (77,6%)	90 (77,6%)	
Histología intraductal			
Si	21 (36,2%)	58 (50%)	0,085
No	37 (63,8%)	58 (50%)	
Patrón cribiforme			
Si	31 (53,4%)	50 (43,1%)	0,197
No	27 (46,6%)	66 (56,9%)	
Alteración <i>BRCA2</i> en tumor primario			
No	0	91 (78,4%)	<0,001
Monoalélica (LOH, <i>gBRCA2</i>)	24 (41,4%)	3 (2,6%)	
Bialélica (LOH+ <i>gBRCA2</i> o del bialélica)	25 (43,1%)	17 (14,7%)	
No resultados	9 (15,5%)	5 (4,3%)	
PTEN en tumor primario			
PTEN + (normal/pérdida heterocigota)	32 (55%)	83 (71,6%)	0,046
PTEN - (pérdida homocigota)	23 (39,6%)	30 (25,9%)	
No resultados	3 (5,2%)	3 (2,5%)	

La distribución en porcentaje de cada variable incluye a los pacientes con datos desconocidos, pero para los test estadísticos se excluyeron los pacientes con datos perdidos o desconocidos

*Gleason Score y tipo de tejido tumoral fueron variable de emparejamiento

De forma esperable, la presencia de alteraciones en *BRCA2*, tanto mono-alélicas (49,0% vs 2,7%) como bi-alélicas (51,0% vs 15,2%, $p < 0,001$) fue más frecuente en aquellos pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2* que en los no portadores. La pérdida de *PTEN* fue también más frecuente en los casos que en los controles (41,8% vs 26,5%, $p = 0,046$), sin embargo, la prevalencia del reordenamiento de *TMPRSS2-ERG* fue similar en ambos grupos (54,9% vs 52,5%, $p = 0,820$).

Las histologías IDC y CRIB estuvieron presentes en el 45,5% ($n = 79$) y el 46,6% ($n = 81$) de todas las muestras analizadas, respectivamente, sin encontrarse diferencias significativas en cuanto al tipo de tejido tumoral (biopsia vs prostatectomía). La morfología IDC fue más frecuente en los tumores con grupo 4 de Gleason en comparación con los grupos 1-3 de Gleason ($p = 0,013$). Las alteraciones somáticas bi-alélicas en *BRCA2* fueron significativamente más frecuentes en los tumores con morfología IDC que en los que no presentaban este patrón (42,7% vs 11,8%, $p < 0,001$). La pérdida de *PTEN* estaba presente en casi la mitad de los casos con morfología IDC (48,7%) en comparación con el 17,4% de los tumores sin esta histología ($p < 0,001$). En conjunto, la odds ratio (OR) para la presencia de morfología IDC fue mayor en los tumores con alteraciones bi-alélicas en *BRCA2* (OR 5,1; IC95% 1,9-13,5), pérdida de *PTEN* (OR 5,1; HR95% 2,1-12,6) o la combinación de ambas alteraciones (OR 23,0; IC95% 4,9-107,2), en comparación con aquellos tumores sin ninguna de estas alteraciones. El modelo de regresión logística multivariable confirmó la asociación independiente de las alteraciones bi-alélicas en *BRCA2* ($p = 0,031$) y la pérdida de *PTEN* ($p < 0,001$) con la morfología IDC. Por el contrario, el reordenamiento de *TMPRSS2-ERG* no se asoció con la presencia de este patrón histológico ($p = 0,265$) (tabla 18).

La morfología CRIB fue significativamente más frecuente en pacientes con mayores niveles de PSA al diagnóstico ($p = 0,005$) y mayor estadio local T ($p = 0,005$). Las alteraciones bi-alélicas en *BRCA2* también se asociaron con una mayor probabilidad de presentar patrón CRIB (45,2% vs 10,3%, $p < 0,001$). Por el contrario, la pérdida de *PTEN* o la fusión de *TMPRSS2-ERG* no se asociaron de manera significativa con este patrón. El modelo multivariable confirmó que tanto el grupo 4 de Gleason como los niveles elevados

de PSA al diagnóstico y las alteraciones bi-alélicas de *BRCA2* fueron factores independientes asociados a la presencia de patrón CRIB (tabla 18).

Tabla 18: Análisis de regresión logística multivariable

	IDC		CRIB		IDC/CRIB	
	Análisis MV	p-valor	Análisis MV	p-valor	Análisis MV	p-valor
	OR (IC 95%)		OR (IC 95%)		OR (IC 95%)	
Mutación <i>gBRCA2</i>						
Sí vs No	0,4 (0,1-1,9)	0,248	1,2 (0,3-4,7)	0,819	1,6 (0,3-7,8)	0,586
Tejido tumoral						
Prostatectomía vs Biopsia	2,3 (0,9-6,0)	0,099	1,8 (0,7-4,2)	0,194	1,7 (0,7-4,1)	0,226
Grupo Grado Gleason						
≥4 vs 1-3	1,9 (1,1-4,9)	0,136	2,9 (1,3-6,3)	0,009	2,2 (1,0-4,8)	0,058
Estadio local (T)						
T2 vs T1	2,5 (0,9-7,2)	0,091	1,5 (0,6-4,2)	0,403	2 (0,8-5,3)	0,158
T3-4 vs T1	2,3 (0,6-9,2)	0,224	3,1 (0,8-11,4)	0,087	2,9(0,8-10,7)	0,12
Edad al diagnóstico						
>65 vs ≤65 años	0,6 (0,3-1,3)	0,192	0,7 (0,3-1,4)	0,297	0,7 (0,3-1,5)	0,326
Mediana PSA						
>mediana vs ≤mediana	0,739 (0,3-1,9)	0,525	4,1 (1,6-10,5)	0,004	2,5 (1,1-6,0)	0,038
Alteración <i>BRCA2</i>						
Mono-alélica vs normal	0,2 (0-1,5)	0,128	0,9 (0,2-4,6)	0,916	0,5 (0,1-2,8)	0,429
Bi-alélica vs normal	4,3 (1,1-16,2)	0,031	5,6 (1,7-19,3)	0,006	4,6 (1,1-19,6)	0,041
PTEN tumor primario						
Pérdida homocigota vs no	5,2 (2,1-13,1)	<0,001	0,8 (0,3-1,8)	0,566	2,4 (1,0-5,8)	0,059

Abreviaturas: OR – Odds ratio; IDC – Intraductal; CRIB – Cribiforme; IC – Intervalo de confianza

En los últimos años se ha establecido la importancia que tienen desde el punto de vista clínico las histologías IDC y CRIB, ya que diferentes estudios han identificado que son factores pronósticos independientes de recurrencia y mortalidad^{25,42,233}. Estos patrones están asociados con determinadas alteraciones genómicas, como las amplificaciones de 8q24 (que contiene al oncogén *c-MYC*) y deleciones de 8p, 6q y 13q (este último contiene el locus del gene *BRCA2*)^{29,234}. La pérdida de *PTEN* también se ha descrito de forma frecuente asociada al patrón IDC²³⁵, mientras que las mutaciones en *ATM* y *SPOP* son eventos más frecuentes en tumores con histología CRIB³⁰. La presencia

de otros genes relacionados con la reparación del ADN, más allá de *BRCA2*, también se ha correlacionado con la histología IDC.

En una serie de 150 pacientes con cáncer de próstata, incluyendo 21 portadores de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en línea germinal (9 *BRCA2*, 3 *ATM*, 3 *CHEK2*, 2 *BRCA1*, 1 *CDH1*, 1 *MSH6*, 1 *NBN*, 1 *PALB2*), la mitad de ellos (48%) presentaron histologías IDC o ductal, en comparación con solo el 12% de los no portadores ($p < 0,003$)³⁹. Sin embargo, cabe destacar que en este estudio, la presencia de mutaciones germinales ya se conocía de forma previa a la revisión del patrón IDC, lo cual pudo suponer un sesgo de selección. En otro estudio, 2 de los 13 (23%) tumores de próstata con defectos en genes de la vía MMR tenían histologías ductales o IDC, en comparación con 14 de los 114 (12%) de los tumores de no portadores⁴⁰. La validación de estos hallazgos en estudios más amplios es fundamental para apoyar la recomendación de realizar cribado de mutaciones germinales a todos los pacientes con cáncer de próstata con estas histologías.

El patrón IDC se define como una proliferación neoplásica epitelial que llena los conductos glandulares o acinares, con la preservación total o parcial de la capa de células basales. A menudo se asocia a un componente adyacente o invasivo de patrón CRIB, lo que puede ocasionar que la presencia de la morfología IDC pase desapercibida si no se realiza una tinción específica de las células basales³². De hecho, existen estudios sobre el impacto clínico de estas alteraciones en los cuales no se hace una distinción clara entre ellas³⁷.

En nuestra serie, hemos analizado los patrones IDC y CRIB de forma independiente, pero teniendo en cuenta que en determinados casos no es factible distinguir entre ambas entidades, también hemos estudiado la asociación entre las alteraciones germinales y/o somáticas en *BRCA2* con la presencia de IDC y/o CRIB. Ninguna de estas histologías, ya sea por separado o en conjunto, se correlacionó con las mutaciones germinales en *BRCA2*. Sin embargo, las tres entidades (IDC, CRIB e IDC y/o CRIB) se asociaron de manera independiente con la pérdida bi-alélica de *BRCA2*, independientemente del origen somático o germinal de las alteraciones.

La pérdida bi-alélica de *BRCA2* suele ser un evento temprano en los tumores de próstata^{145,236}, y esta pérdida completa de la función de *BRCA2* podría tener el potencial

de afectar a la morfología del tumor. Sin embargo, los tumores con una mutación patogénica en *BRCA2* con el segundo alelo intacto conservan parte de la función de la proteína BRCA2, lo cual podría prevenir en cierta manera la aparición de patrones IDC y/o CRIB.

La elevada prevalencia de alteraciones bi-alélicas en *BRCA2* descrita hasta en un 70% de los tumores de próstata de pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*^{145,224}, puede haber actuado como factor de confusión en estudios previos en los cuales se ha observado una asociación entre el patrón IDC y las mutaciones *gBRCA2*. Esto se debe a que ninguno de estos estudios tuvo en cuenta los eventos somáticos en *BRCA2*^{38,39,128}. Risbridger *et al*³⁸ observaron por primera vez una mayor incidencia de IDC en xenoinjertos derivados de pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*. Una revisión histopatológica retrospectiva identificó la presencia de patrón IDC en el 42% de 33 tumores de pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*, en comparación en el 9% de 32 tumores no portadores³⁸. En el análisis univariante, los pacientes *gBRCA2* con histología IDC tuvieron una menor supervivencia global en comparación con los portadores sin IDC.

En otro estudio, el análisis genómico de 14 tumores de portadores de mutaciones *gBRCA2* reveló la presencia de diferentes perfiles genómicos y epigenéticos en los 8 casos con histología IDC¹²⁸, incluyendo amplificaciones de *MED12L/MED12*. Estas alteraciones se han asociado con mayor agresividad clínica en cáncer de próstata¹²⁸ y podrían sustentar la base de que la presencia de IDC tiene un impacto clínico negativo en pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido validada, ya que ninguno de los estudios más amplios sobre el papel de las mutaciones germinales de *BRCA2* en cáncer de próstata ha tenido en cuenta los subtipos histológicos.

Aunque uno de los puntos fuertes de este análisis es que los patólogos desconocían la presencia de mutaciones germinales al clasificar los tumores con histologías IDC y/o CRIB, existen algunas limitaciones en el estudio. En primer lugar, el diseño nos ha permitido establecer la prevalencia de los patrones IDC y CRIB en los tumores de pacientes portadores de mutaciones *gBRCA2*, pero no se ha podido determinar con precisión la verdadera prevalencia de las alteraciones *gBRCA2* en estas dos histologías. En segundo lugar, en dos tercios de los pacientes no fue posible analizar las mutaciones somáticas en *BRCA2* que potencialmente podrían causar la pérdida de función de la

proteína (mutaciones puntuales o indels). Por lo tanto, es probable que el número de tumores con alteraciones somáticas en *BRCA2* en nuestra serie sea mayor, especialmente en los portadores de mutaciones *gBRCA2*. Sin embargo, es importante resaltar que la gran mayoría de las alteraciones somáticas son deleciones, que son detectadas tanto por FISH como por NGS. Por consiguiente, y a modo de conclusión, la asociación entre las histologías IDC y CRIB y las alteraciones bi-alélicas de *BRCA2* deber considerarse como una hipótesis pendiente de confirmación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El análisis de los tres estudios publicados que componen esta tesis doctoral nos ha permitido formular las siguientes conclusiones:

1. PROREPAIR-B es el primer estudio diseñado para analizar la prevalencia de mutaciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en población de origen mediterráneo. En este trabajo hemos confirmado que *BRCA2* es el gen más frecuentemente alterado en una población no seleccionada de pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico.
2. La presencia de mutaciones a nivel germinal en *BRCA2* es un factor de mal pronóstico independiente en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico. Además, su impacto podría estar condicionado por el tipo de tratamiento recibido en primera línea (taxanos versus inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones germinales en *BRCA2* podrían ser el primer biomarcador para seleccionar el tratamiento en pacientes con CPRCm.
3. El estudio PROREPAIR-A ha demostrado que los tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* presentan una mayor prevalencia de alteraciones somáticas en comparación con los tumores de pacientes no portadores. Entre las alteraciones más comunes en esta población destacan la co-delección de *BRCA2-RB1* (41%) y la amplificación de *MYC* (53%).
4. La co-delección *BRCA2-RB1* y la amplificación de *MYC* representan eventos somáticos que se asocian con un comportamiento clínico más agresivo en pacientes portadores de alteraciones germinales en *BRCA2* (*gBRCA2*) en comparación con aquellos *gBRCA2* que no presentan dichas alteraciones. Ambos eventos se relacionan de manera independiente con una menor supervivencia causa-específica.

5. En nuestro estudio, que incluyó casos (portadores de mutaciones germinales en *BRCA2*) y controles (no portadores), no encontramos una asociación clara entre las mutaciones germinales en *BRCA2* y la presencia de patrones intraductal o cribiforme, a menos que se acompañen de otros eventos genómicos. Observamos que la presencia de alteraciones bialélicas en *BRCA2* y la pérdida homocigota de *PTEN* se relacionaron de manera independiente con la histología intraductal. Del mismo modo, el patrón cribiforme se asoció también de forma independiente con la presencia de alteraciones bialélicas en *BRCA2*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Apr 5;
2. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*. 2020 Jan;77(1):38–52.
3. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, Fainberg J, Mungovan SF, Bratt O, et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *Eur Urol*. 2023 May 16;
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [Internet]. 2020 [cited 2023 Jun 11]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
5. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int*. 2002 Jul;90(2):174–84.
6. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Mar 18;101(6):374–83.
7. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jul 3;94(13):981–90.
8. Las cifras del cáncer en España. 2023.
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7–33.
10. Taitt HE. Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. *Am J Mens Health*. 2018 Nov;12(6):1807–23.
11. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):23–34.
12. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26;360(13):1320–8.
13. Collin SM, Martin RM, Metcalfe C, Gunnell D, Albertsen PC, Neal D, et al. Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study. *Lancet Oncol*. 2008 May;9(5):445–52.
14. Jardel P, Debiais C, Godet J, Irani J, Fromont G. Ductal carcinoma of the prostate shows a different immunophenotype from high grade acinar cancer. *Histopathology*. 2013 Jul;63(1):57–63.

15. Morgan TM, Welty CJ, Vakar-Lopez F, Lin DW, Wright JL. Ductal adenocarcinoma of the prostate: increased mortality risk and decreased serum prostate specific antigen. *J Urol*. 2010 Dec;184(6):2303–7.
16. Vinceneux A, Bruyère F, Haillet O, Charles T, de la Taille A, Salomon L, et al. Ductal adenocarcinoma of the prostate: Clinical and biological profiles. *Prostate*. 2017 Sep;77(12):1242–50.
17. Mikuz G. Histologic classification of prostate cancer. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2015 Feb;37(1):39–47.
18. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*. 1966 Mar;50(3):125–8.
19. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244–52.
20. van Leenders GJLH, van der Kwast TH, Grignon DJ, Evans AJ, Kristiansen G, Kweldam CF, et al. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2020 Aug;44(8):e87–99.
21. Netto GJ, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, et al. The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):469–82.
22. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*. 2016 Mar;69(3):428–35.
23. Hassan O, Matoso A. Clinical significance of subtypes of Gleason pattern 4 prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2018 Sep;7(Suppl 4):S477–83.
24. Choy B, Pearce SM, Anderson BB, Shalhav AL, Zagaja G, Eggener SE, et al. Prognostic Significance of Percentage and Architectural Types of Contemporary Gleason Pattern 4 Prostate Cancer in Radical Prostatectomy. *Am J Surg Pathol*. 2016 Oct;40(10):1400–6.
25. Kweldam CF, Kümmerlin IP, Nieboer D, Verhoef EI, Steyerberg EW, van der Kwast TH, et al. Disease-specific survival of patients with invasive cribriform and intraductal prostate cancer at diagnostic biopsy. *Mod Pathol*. 2016 Jun;29(6):630–6.
26. Siadat F, Sykes J, Zlotta AR, Aldaoud N, Egawa S, Pushkar D, et al. Not all gleason pattern 4 prostate cancers are created equal: A study of latent prostatic carcinomas in a cystoprostatectomy and autopsy series. *Prostate*. 2015 Sep;75(12):1277–84.
27. Tom MC, Nguyen JK, Lucianò R, Mian OY, Stephans KL, Ciezki JP, et al. Impact of Cribriform Pattern and Intraductal Carcinoma on Gleason 7 Prostate Cancer Treated with External Beam Radiotherapy. *J Urol*. 2019 Oct;202(4):710–6.

28. van der Kwast TH, van Leenders GJ, Berney DM, Delahunt B, Evans AJ, Iczkowski KA, et al. ISUP Consensus Definition of Cribriform Pattern Prostate Cancer. *Am J Surg Pathol*. 2021 Aug 1;45(8):1118–26.
29. Böttcher R, Kweldam CF, Livingstone J, Lalonde E, Yamaguchi TN, Huang V, et al. Cribriform and intraductal prostate cancer are associated with increased genomic instability and distinct genomic alterations. *BMC Cancer*. 2018 Jan 2;18(1):8.
30. Elfandy H, Armenia J, Pederzoli F, Pullman E, Pertega-Gomes N, Schultz N, et al. Genetic and Epigenetic Determinants of Aggressiveness in Cribriform Carcinoma of the Prostate. *Mol Cancer Res*. 2019 Feb;17(2):446–56.
31. Shah RB, Shore KT, Yoon J, Mendrinis S, McKenney JK, Tian W. PTEN loss in prostatic adenocarcinoma correlates with specific adverse histologic features (intraductal carcinoma, cribriform Gleason pattern 4 and stromogenic carcinoma). *Prostate*. 2019 Aug;79(11):1267–73.
32. Guo CC, Epstein JI. Intraductal carcinoma of the prostate on needle biopsy: Histologic features and clinical significance. *Mod Pathol*. 2006 Dec;19(12):1528–35.
33. Kench JG, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Cree IA, Gill AJ, et al. WHO Classification of Tumours fifth edition: evolving issues in the classification, diagnosis, and prognostication of prostate cancer. *Histopathology*. 2022 Oct;81(4):447–58.
34. Robinson BD, Epstein JI. Intraductal carcinoma of the prostate without invasive carcinoma on needle biopsy: emphasis on radical prostatectomy findings. *J Urol*. 2010 Oct;184(4):1328–33.
35. Kimura K, Tsuzuki T, Kato M, Saito AM, Sassa N, Ishida R, et al. Prognostic value of intraductal carcinoma of the prostate in radical prostatectomy specimens. *Prostate*. 2014 May;74(6):680–7.
36. Khani F, Epstein JI. Prostate Biopsy Specimens With Gleason 3+3=6 and Intraductal Carcinoma: Radical Prostatectomy Findings and Clinical Outcomes. *Am J Surg Pathol*. 2015 Oct;39(10):1383–9.
37. van Leenders GJLH, van der Kwast TH, Iczkowski KA. The 2019 International Society of Urological Pathology Consensus Conference on Prostate Cancer Grading. *Eur Urol*. 2021 Jun;79(6):707–9.
38. 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*. 2015 Mar;67(3):496–503.
39. 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 Apr;78(5):401–7.
40. Antonarakis ES, Shaikat F, Isaacsson Velho P, Kaur H, Shenderov E, Pardoll DM, et al. Clinical Features and Therapeutic Outcomes in Men with Advanced

- Prostate Cancer and DNA Mismatch Repair Gene Mutations. *Eur Urol*. 2019 Mar;75(3):378–82.
41. Schaeffer EM, ω C, An Y, Barocas D, ω M, Bitting R, et al. NCCN Guidelines Version 1.2023 Prostate Cancer [Internet]. 2022. Available from: <https://www.nccn.org/home/>
 42. Kweldam CF, Wildhagen MF, Steyerberg EW, Bangma CH, van der Kwast TH, van Leenders GJLH. Cribriform growth is highly predictive for postoperative metastasis and disease-specific death in Gleason score 7 prostate cancer. *Mod Pathol*. 2015 Mar;28(3):457–64.
 43. Dawkins HJ, Sellner LN, Turbett GR, Thompson CA, Redmond SL, McNeal JE, et al. Distinction between intraductal carcinoma of the prostate (IDC-P), high-grade dysplasia (PIN), and invasive prostatic adenocarcinoma, using molecular markers of cancer progression. *Prostate*. 2000 Sep 1;44(4):265–70.
 44. 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 Sep 16;280(11):969–74.
 45. Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR. The CAPRA-S score: A straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. *Cancer*. 2011 Nov 15;117(22):5039–46.
 46. Bruinsma SM, Roobol MJ, Carroll PR, Klotz L, Pickles T, Moore CM, et al. Expert consensus document: Semantics in active surveillance for men with localized prostate cancer - results of a modified Delphi consensus procedure. *Nat Rev Urol*. 2017 May;14(5):312–22.
 47. 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. *Annals of Oncology*. 2020 Sep;31(9):1119–34.
 48. 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*. 2021 Feb;79(2):243–62.
 49. González del Alba A, Méndez-Vidal MJ, Vazquez S, Castro E, Climent MA, Gallardo E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced prostate cancer (2020). *Clinical and Translational Oncology*. 2021 May 24;23(5):969–79.
 50. Shipley WU, Seiferheld W, Lukka HR, Major PP, Heney NM, Grignon DJ, et al. Radiation with or without Antiandrogen Therapy in Recurrent Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017 Feb 2;376(5):417–28.
 51. D’Amico A V., Chen MH, Renshaw AA, Loffredo M, Kantoff PW. Androgen Suppression and Radiation vs Radiation Alone for Prostate Cancer. *JAMA*. 2008 Jan 23;299(3).
 52. Jones CU, Hunt D, McGowan DG, Amin MB, Chetner MP, Bruner DW, et al. Radiotherapy and Short-Term Androgen Deprivation for Localized Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jul 14;365(2):107–18.

53. Roach M, Bae K, Speight J, Wolkov HB, Rubin P, Lee RJ, et al. Short-Term Neoadjuvant Androgen Deprivation Therapy and External-Beam Radiotherapy for Locally Advanced Prostate Cancer: Long-Term Results of RTOG 8610. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Feb 1;26(4):585–91.
54. Bolla M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PMP, et al. Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 May 20;34(15):1748–56.
55. Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh ACM, Oddens J, Poortmans PMP, et al. Duration of Androgen Suppression in the Treatment of Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009 Jun 11;360(24):2516–27.
56. Zumsteg ZS, Spratt DE, Daskivich TJ, Tighiouart M, Luu M, Rodgers JP, et al. Effect of Androgen Deprivation on Long-term Outcomes of Intermediate-Risk Prostate Cancer Stratified as Favorable or Unfavorable. *JAMA Netw Open*. 2020 Sep 9;3(9):e2015083.
57. Pisansky TM, Hunt D, Gomella LG, Amin MB, Balogh AG, Chinn DM, et al. Duration of Androgen Suppression Before Radiotherapy for Localized Prostate Cancer: Radiation Therapy Oncology Group Randomized Clinical Trial 9910. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 Feb 1;33(4):332–9.
58. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 May 20;26(15):2497–504.
59. Kishan AU, Wang X, Seiferheld W, Collette L, Sandler KA, Sandler HM, et al. Association of Gleason Grade With Androgen Deprivation Therapy Duration and Survival Outcomes. *JAMA Oncol*. 2019 Jan 1;5(1):91.
60. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Oct 13;375(15):1415–24.
61. Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, et al. Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Oct 13;375(15):1425–37.
62. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, Chen RC, Crispino T, Fontanarosa J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part I: Risk Stratification, Shared Decision Making, and Care Options. *J Urol*. 2018 Mar;199(3):683–90.
63. Han M, Partin AW, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Era specific biochemical recurrence-free survival following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2001 Aug;166(2):416–9.
64. Graham J, Baker M, Macbeth F, Titshall V, Guideline Development Group. Diagnosis and treatment of prostate cancer: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2008 Mar 15;336(7644):610–2.

65. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 15;12(6):1665–71.
66. Ang JE, Olmos D, de Bono JS. CYP17 blockade by abiraterone: further evidence for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009 Mar 10;100(5):671–5.
67. Bernard B, Muralidhar V, Chen YH, Sridhar SS, Mitchell EP, Pettaway CA, et al. Impact of ethnicity on the outcome of men with metastatic, hormone-sensitive prostate cancer. *Cancer*. 2017 May 1;123(9):1536–44.
68. Francini E, Gray KP, Xie W, Shaw GK, Valença L, Bernard B, et al. Time of metastatic disease presentation and volume of disease are prognostic for metastatic hormone sensitive prostate cancer (mHSPC). *Prostate*. 2018 Sep;78(12):889–95.
69. Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, Higano C, Basch E, Fizazi K, et al. Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Apr 20;34(12):1402–18.
70. Sartor O, de Bono JS. Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Feb 15;378(7):645–57.
71. Lee CH, Kantoff P. Treatment of Metastatic Prostate Cancer in 2018. *JAMA Oncol*. 2019 Feb 1;5(2):263–4.
72. 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. *New England Journal of Medicine*. 2004 Oct 7;351(15):1502–12.
73. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and Estramustine Compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004 Oct 7;351(15):1513–20.
74. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, 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*. 2010 Oct 2;376(9747):1147–54.
75. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2013 Jan 10;368(2):138–48.
76. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2014 Jul 31;371(5):424–33.
77. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011 May 26;364(21):1995–2005.
78. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012 Sep 27;367(13):1187–97.

79. 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. *New England Journal of Medicine*. 2013 Jul 18;369(3):213–23.
80. Sartor O, de Bono J, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, et al. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021 Sep 16;385(12):1091–103.
81. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Aug 20;373(8):737–46.
82. 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. *The Lancet*. 2016 Mar;387(10024):1163–77.
83. 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 Feb;14(2):149–58.
84. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017 Jul 27;377(4):352–60.
85. 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. *New England Journal of Medicine*. 2017 Jul 27;377(4):338–51.
86. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jul 4;381(1):13–24.
87. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2019 Nov 10;37(32):2974–86.
88. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jul 11;381(2):121–31.
89. Fizazi K, Foulon S, Carles J, Roubaud G, McDermott R, Fléchon A, et al. Abiraterone plus prednisone added to androgen deprivation therapy and docetaxel in de novo metastatic castration-sensitive prostate cancer (PEACE-1): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study with a 2 × 2 factorial design. *The Lancet*. 2022 Apr;399(10336):1695–707.
90. Smith MR, Hussain M, Saad F, Fizazi K, Sternberg CN, Crawford ED, et al. Darolutamide and Survival in Metastatic, Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Mar 24;386(12):1132–42.

91. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2018 Dec;392(10162):2353–66.
92. Boevé LMS, Hulshof MCCM, Vis AN, Zwinderman AH, Twisk JWR, Witjes WPJ, et al. Effect on Survival of Androgen Deprivation Therapy Alone Compared to Androgen Deprivation Therapy Combined with Concurrent Radiation Therapy to the Prostate in Patients with Primary Bone Metastatic Prostate Cancer in a Prospective Randomised Clinical Trial: Data from the HORRAD Trial. *Eur Urol*. 2019 Mar;75(3):410–8.
93. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Apr 12;378(15):1408–18.
94. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Mar 28;380(13):1235–46.
95. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer and Survival with Darolutamide. *New England Journal of Medicine*. 2020 Sep 10;383(11):1040–9.
96. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jun 28;378(26):2465–74.
97. Sternberg CN, Fizazi K, Saad F, Shore ND, De Giorgi U, Penson DF, et al. Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Jun 4;382(23):2197–206.
98. 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*. 2021 Feb;124(3):552–63.
99. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):1011–25.
100. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JWF, Culig Z, Grönberg H, et al. The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol*. 2013 Oct;64(4):567–76.
101. 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 Jul 12;487(7406):239–43.
102. Kumar A, White TA, MacKenzie AP, Clegg N, Lee C, Dumpit RF, et al. Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 11;108(41):17087–92.
103. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2010 Jul;18(1):11–22.
104. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015 May 21;161(5):1215–28.

105. 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 Jul;2017.
106. 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. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 4;375(5):443–53.
107. 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 (1979)*. 2005 Oct 28;310(5748):644–8.
108. 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 Aug 2;448(7153):595–9.
109. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the *TMPRSS2-ERG* Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia*. 2008 Feb;10(2):177-IN9.
110. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, et al. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *Eur Urol*. 2009 Aug;56(2):275–86.
111. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, et al. *TMPRSS2:ERG* Fusion-Associated Deletions Provide Insight into the Heterogeneity of Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8337–41.
112. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. 2009 Mar 11;458(7234):97–101.
113. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, et al. *TMPRSS2-ERG* Fusion Prostate Cancer: An Early Molecular Event Associated With Invasion. *American Journal of Surgical Pathology*. 2007 Jun;31(6):882–8.
114. Park K, Dalton JT, Narayanan R, Barbieri CE, Hancock ML, Bostwick DG, et al. *TMPRSS2:ERG* Gene Fusion Predicts Subsequent Detection of Prostate Cancer in Patients With High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Jan 20;32(3):206–11.
115. Lin DW, Newcomb LF, Brown EC, Brooks JD, Carroll PR, Feng Z, et al. Urinary *TMPRSS2:ERG* and *PCA3* in an Active Surveillance Cohort: Results from a Baseline Analysis in the Canary Prostate Active Surveillance Study. *Clinical Cancer Research*. 2013 May 1;19(9):2442–50.
116. 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 Jan 10;27(3):253–63.
117. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, Stack EC, et al. The *TMPRSS2:ERG* Rearrangement, *ERG* Expression, and Prostate Cancer Outcomes: A Cohort Study and Meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2012 Sep 1;21(9):1497–509.

118. 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 May 2;50(5):645–51.
119. Quigley DA, Dang HX, Zhao SG, Lloyd P, Aggarwal R, Alumkal JJ, et al. Genomic Hallmarks and Structural Variation in Metastatic Prostate Cancer. *Cell.* 2018 Jul;174(3):758-769.e9.
120. 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.* 2019 Jul;76(1):89–97.
121. Abida W, Cyrta J, Heller G, Prandi D, Armenia J, Coleman I, et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019 Jun 4;116(23):11428–36.
122. 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. *Clinical Cancer Research.* 2016 Mar 15;22(6):1520–30.
123. Tan HL, Sood A, Rahimi HA, Wang W, Gupta N, Hicks J, et al. Rb Loss Is Characteristic of Prostatic Small Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2014 Feb 15;20(4):890–903.
124. 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.* 2017 May;71(5):697–700.
125. 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 Jan 15;76(2):283–92.
126. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012 Jun 20;44(6):685–9.
127. Koh CM, Bieberich CJ, Dang C V., Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. *MYC* and Prostate Cancer. *Genes Cancer.* 2010 Jun 1;1(6):617–28.
128. 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.* 2017 Jan 9;8(1):13671.
129. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993 Apr;362(6422):709–15.
130. Lindahl T, Wood RD. Quality Control by DNA Repair. *Science (1979).* 1999 Dec 3;286(5446):1897–905.
131. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2008 Aug;9(8):619–31.
132. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.* 2002 Dec 16;21(58):8949–56.
133. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008 Jan 24;18(1):85–98.

134. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Apr 1;7(4):a016600.
135. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Jun 5;17(6):337–49.
136. Deriano L, Roth DB. Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu Rev Genet.* 2013 Nov 23;47(1):433–55.
137. 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. *Journal of Clinical Oncology.* 2013 May 10;31(14):1748–57.
138. Reimers MA, Yip SM, Zhang L, Cieslik M, Dhawan M, Montgomery B, et al. Clinical Outcomes in Cyclin-dependent Kinase 12 Mutant Advanced Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2020 Mar;77(3):333–41.
139. Antonarakis ES, Isaacs P, Velho P, Fu W, Wang H, Agarwal N, Santos VS, et al. *CDK12* -Altered Prostate Cancer: Clinical Features and Therapeutic Outcomes to Standard Systemic Therapies, Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors, and PD-1 Inhibitors. *JCO Precis Oncol.* 2020 Nov;4(4):370–81.
140. Schweizer MT, Ha G, Gulati R, Brown LC, McKay RR, Dorff T, et al. *CDK12* - Mutated Prostate Cancer: Clinical Outcomes With Standard Therapies and Immune Checkpoint Blockade. *JCO Precis Oncol.* 2020 Nov;4(4):382–92.
141. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2020 May 28;382(22):2091–102.
142. de Bono JS, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu SK, Mehra N, et al. Central, prospective detection of homologous recombination repair gene mutations (HRRm) in tumour tissue from >4000 men with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) screened for the PROfound study. *Annals of Oncology.* 2019 Oct;30:v328–9.
143. 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.* 2019 Apr 1;5(4):471.
144. Wu YM, Cieřlik M, Lonigro RJ, Vats P, Reimers MA, Cao X, et al. Inactivation of *CDK12* Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. *Cell.* 2018 Jun;173(7):1770-1782.e14.
145. Jonsson P, Bandlamudi C, Cheng ML, Srinivasan P, Chavan SS, Friedman ND, et al. Tumour lineage shapes *BRCA*-mediated phenotypes. *Nature.* 2019 Jul 10;571(7766):576–9.
146. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2019 Feb 1;37(4):286–95.
147. Kuzbari Z, Bandlamudi C, Loveday C, Garrett A, Mehine M, George A, et al. Germline-focused analysis of tumour-detected variants in 49,264 cancer patients:

- ESMO Precision Medicine Working Group recommendations. *Ann Oncol*. 2023 Mar;34(3):215–27.
148. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2020 Aug 20;38(24):2798–811.
149. Cornford P, 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. Part II—2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2021 Feb;79(2):263–82.
150. 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*. 2015 Aug;68(2):186–93.
151. 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 May;75(5):743–9.
152. Annala M, Vandekerkhove G, Khalaf D, Taavitsainen S, Beja K, Warner EW, et al. Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discov*. 2018 Apr 1;8(4):444–57.
153. Yadav S, Hart SN, Hu C, Hillman D, Lee KY, Gnanaolivu R, et al. Contribution of Inherited DNA-Repair Gene Mutations to Hormone-Sensitive and Castrate-Resistant Metastatic Prostate Cancer and Implications for Clinical Outcome. *JCO Precis Oncol*. 2019 Dec;(3):1–12.
154. Vandekerkhove G, Struss WJ, Annala M, Kallio HML, Khalaf D, Warner EW, et al. Circulating Tumor DNA Abundance and Potential Utility in De Novo Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019 Apr;75(4):667–75.
155. Annala M, Struss WJ, Warner EW, Beja K, Vandekerkhove G, Wong A, et al. Treatment Outcomes and Tumor Loss of Heterozygosity in Germline DNA Repair-deficient Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017 Jul;72(1):34–42.
156. 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*. 2018 Aug;74(2):218–25.
157. 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*. 2018 May;73(5):687–93.
158. Sokol ES, Pavlick D, Frampton GM, Ross JS, Miller VA, Ali SM, et al. Pan-Cancer Analysis of *CDK12* Loss-of-Function Alterations and Their Association with the Focal Tandem-Duplicator Phenotype. *Oncologist*. 2019 Dec 1;24(12):1526–33.

159. Nguyen B, Mota JM, Nandakumar S, Stopsack KH, Weg E, Rathkopf D, et al. Pan-cancer Analysis of CDK12 Alterations Identifies a Subset of Prostate Cancers with Distinct Genomic and Clinical Characteristics. *Eur Urol*. 2020 Nov;78(5):671–9.
160. Ritch E, Fu SYF, Herberts C, Wang G, Warner EW, Schönlau E, et al. Identification of Hypermutation and Defective Mismatch Repair in ctDNA from Metastatic Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020 Mar 1;26(5):1114–25.
161. Rodrigues DN, Rescigno P, Liu D, Yuan W, Carreira S, Lambros MB, et al. Immunogenomic analyses associate immunological alterations with mismatch repair defects in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2018 Nov 1;128(11):5185–5185.
162. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, et al. Pathologic Complete Response Rates in Young Women With *BRCA1* -Positive Breast Cancers After Neoadjuvant Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jan 20;28(3):375–9.
163. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):747–56.
164. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, et al. Association of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Survival, Chemotherapy Sensitivity, and Gene Mutator Phenotype in Patients With Ovarian Cancer. *JAMA*. 2011 Oct 12;306(14):1557.
165. Sternberg CN, Petrylak DP, Sartor O, Witjes JA, Demkow T, Ferrero JM, et al. Multinational, Double-Blind, Phase III Study of Prednisone and Either Satraplatin or Placebo in Patients With Castrate-Refractory Prostate Cancer Progressing After Prior Chemotherapy: The SPARC Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Nov 10;27(32):5431–8.
166. Hager S, Ackermann CJ, Joerger M, Gillessen S, Omlin A. Anti-tumour activity of platinum compounds in advanced prostate cancer—a systematic literature review. *Annals of Oncology*. 2016 Jun;27(6):975–84.
167. Cheng HH, Pritchard CC, Boyd T, Nelson PS, Montgomery B. Biallelic Inactivation of BRCA2 in Platinum-sensitive Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016 Jun;69(6):992–5.
168. Pomerantz MM, Spisák S, Jia L, Cronin AM, Csabai I, Ledet E, et al. The association between germline *BRCA2* variants and sensitivity to platinum-based chemotherapy among men with metastatic prostate cancer. *Cancer*. 2017 Sep 15;123(18):3532–9.
169. Zafeiriou Z, Bianchini D, Chandler R, Rescigno P, Yuan W, Carreira S, et al. Genomic Analysis of Three Metastatic Prostate Cancer Patients with Exceptional Responses to Carboplatin Indicating Different Types of DNA Repair Deficiency. *Eur Urol*. 2019 Jan;75(1):184–92.

170. Mota JM, Barnett E, Nauseef JT, Nguyen B, Stopsack KH, Wibmer A, et al. Platinum-Based Chemotherapy in Metastatic Prostate Cancer With DNA Repair Gene Alterations. *JCO Precis Oncol*. 2020 Nov;(4):355–66.
171. Murai J, Huang S yin N, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5588–99.
172. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Oct 29;373(18):1697–708.
173. Mateo J, Porta N, Bianchini D, McGovern U, Elliott T, Jones R, et al. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan;21(1):162–74.
174. Hussain M, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Dec 10;383(24):2345–57.
175. 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. *New England Journal of Medicine*. 2019 Dec 26;381(26):2506–18.
176. Khalaf DJ, Annala M, Taavitsainen S, Finch DL, Oja C, Vergidis J, et al. Optimal sequencing of enzalutamide and abiraterone acetate plus prednisone in metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2, crossover trial. *Lancet Oncol*. 2019 Dec;20(12):1730–9.
177. Fizazi K, Piulats JM, Reaume MN, Ostler P, McDermott R, Gingerich JR, et al. Rucaparib or Physician’s Choice in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2023 Feb 23;388(8):719–32.
178. Abida W, Patnaik A, Campbell D, Shapiro J, Bryce AH, McDermott R, et al. Rucaparib in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Harboring a *BRCA1* or *BRCA2* Gene Alteration. *Journal of Clinical Oncology*. 2020 Nov 10;38(32):3763–72.
179. Smith MR, Scher HI, Sandhu S, Efstathiou E, Lara PN, Yu EY, et al. Niraparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and DNA repair gene defects (GALAHAD): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022 Mar;23(3):362–73.
180. de Bono JS, Mehra N, Scagliotti G V, Castro E, Dorff T, Stirling A, et al. Talazoparib monotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair alterations (TALAPRO-1): an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Sep;22(9):1250–64.
181. Abida W, Campbell D, Patnaik A, Shapiro JD, Sautois B, Vogelzang NJ, et al. Non-BRCA DNA Damage Repair Gene Alterations and Response to the PARP Inhibitor Rucaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Analysis From the Phase II TRITON2 Study. *Clinical Cancer Research*. 2020 Jun 1;26(11):2487–96.

182. Antonarakis ES. Cyclin-Dependent Kinase 12, Immunity, and Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Sep 13;379(11):1087–9.
183. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (1979). 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
184. Asim M, Tarish F, Zecchini HI, Sanjiv K, Gelali E, Massie CE, et al. Synthetic lethality between androgen receptor signalling and the PARP pathway in prostate cancer. *Nat Commun*. 2017 Aug 29;8(1):374.
185. Li L, Karanika S, Yang G, Wang J, Park S, Broom BM, et al. Androgen receptor inhibitor–induced “BRCAness” and PARP inhibition are synthetically lethal for castration-resistant prostate cancer. *Sci Signal*. 2017 May 23;10(480).
186. Schiewer MJ, Goodwin JF, Han S, Brenner JC, Augello MA, Dean JL, et al. Dual Roles of PARP-1 Promote Cancer Growth and Progression. *Cancer Discov*. 2012 Dec 1;2(12):1134–49.
187. Clarke NW, Armstrong AJ, Thiery-Vuillemin A, Oya M, Shore N, Loredó E, et al. Abiraterone and Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *NEJM Evidence*. 2022 Aug 23;1(9).
188. Agarwal N, Azad AA, Carles J, Fay AP, Matsubara N, Heinrich D, et al. Talazoparib plus enzalutamide in men with first-line metastatic castration-resistant prostate cancer (TALAPRO-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2023 Jun;
189. Chi KN, Rathkopf D, Smith MR, Efstathiou E, Attard G, Olmos D, et al. Niraparib and Abiraterone Acetate for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2023 Mar 23;
190. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, Goh J, Ojamaa K, Hoimes CJ, et al. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2020 Feb 10;38(5):395–405.
191. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr 4;9(4):357–9.
192. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297–303.
193. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011 May 10;43(5):491–8.
194. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013 Oct 15;43(1).
195. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep 1;38(16):e164–e164.

196. Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat*. 2016 Mar;37(3):235–41.
197. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 17;536(7616):285–91.
198. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D862–8.
199. ACMG Board of Directors. ACMG policy statement: updated recommendations regarding analysis and reporting of secondary findings in clinical genome-scale sequencing. *Genet Med*. 2015 Jan;17(1):68–9.
200. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405–24.
201. Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Kytölä S, Joensuu H, Isola JJ. Amplification of c-myc by Fluorescence In Situ Hybridization in a Population-Based Breast Cancer Tissue Array. *Modern Pathology*. 2001 Oct;14(10):1030–5.
202. Köster J, Rahmann S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*. 2012 Oct 1;28(19):2520–2.
203. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011 May 2;17(1):10.
204. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):3047–8.
205. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
206. Oliphant TE. Python for Scientific Computing. *Comput Sci Eng*. 2007;9(3):10–20.
207. Ebbert MTW, Wadsworth ME, Staley LA, Hoyt KL, Pickett B, Miller J, et al. Evaluating the necessity of PCR duplicate removal from next-generation sequencing data and a comparison of approaches. *BMC Bioinformatics*. 2016 Jul 25;17(S7):239.
208. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2016 Jan 15;32(2):292–4.
209. Raman L, Dheedene A, De Smet M, Van Dorpe J, Menten B. WisecondorX: improved copy number detection for routine shallow whole-genome sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2019 Feb 28;47(4):1605–14.
210. Amemiya HM, Kundaje A, Boyle AP. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci Rep*. 2019 Jun 27;9(1):9354.

211. Langlois R, Pallesen J, Frank J. Reference-free particle selection enhanced with semi-supervised machine learning for cryo-electron microscopy. *J Struct Biol.* 2011 Sep;175(3):353–61.
212. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. 2018 [cited 2023 Jun 12]. Available from: <https://www.r-project.org/>
213. Chang W, Cheng J, Allaire J, Xie Y, McPherson J. Shiny: Web Applications Framework for R [Internet]. 2020 [cited 2023 Jun 12]. Available from: http://chrysalida.imbb.forth.gr:3838/Arthropod_SLC_Database/
214. Rubinstein L V, Gail MH, Santner TJ. Planning the duration of a comparative clinical trial with loss to follow-up and a period of continued observation. *J Chronic Dis.* 1981;34(9–10):469–79.
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.* 2008 Mar 1;26(7):1148–59.
216. Casagrande JT, Pike MC. An improved approximate formula for calculating sample sizes for comparing two binomial distributions. *Biometrics.* 1978 Sep;34(3):483–6.
217. 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 Feb 20;37(6):490–503.
218. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* 2010 Sep;1(3):397–412.
219. Osorio A, Rodríguez-López R, Díez O, de la Hoya M, Ignacio Martínez J, Vega A, et al. The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the CHEK2 gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer.* 2004 Jan 1;108(1):54–6.
220. Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int J Cancer.* 2016 Oct 1;139(7):1557–63.
221. Mandelker D, Zhang L, Kemel Y, Stadler ZK, Joseph V, Zehir A, et al. Mutation Detection in Patients With Advanced Cancer by Universal Sequencing of Cancer-Related Genes in Tumor and Normal DNA vs Guideline-Based Germline Testing. *JAMA.* 2017 Sep 5;318(9):825–35.
222. González-Rivera M, Lobo M, López-Tarruella S, Jerez Y, Del Monte-Millán M, Massarrah T, et al. Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Apr;156(3):507–15.
223. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, Ceballos MI, Roncador G, de la Hoya M, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to

- germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Feb;161(3):597–604.
224. Castro E, Jugurnauth-Little S, Karlsson Q, Al-Shahrour F, Piñeiro-Yañez E, Van de Poll F, et al. High burden of copy number alterations and c-MYC amplification in prostate cancer from BRCA2 germline mutation carriers. *Ann Oncol.* 2015 Nov;26(11):2293–300.
225. Pritchard CC, Salipante SJ, Koehler K, Smith C, Scroggins S, Wood B, et al. Validation and implementation of targeted capture and sequencing for the detection of actionable mutation, copy number variation, and gene rearrangement in clinical cancer specimens. *J Mol Diagn.* 2014 Jan;16(1):56–67.
226. Warner E, Herberts C, Fu S, Yip S, Wong A, Wang G, et al. BRCA2, ATM, and CDK12 Defects Differentially Shape Prostate Tumor Driver Genomics and Clinical Aggression. *Clin Cancer Res.* 2021 Mar 15;27(6):1650–62.
227. Hussain M, Corcoran C, Sibilla C, Fizazi K, Saad F, Shore N, et al. Tumor Genomic Testing for >4,000 Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Phase III Trial PROfound (Olaparib). *Clin Cancer Res.* 2022 Apr 14;28(8):1518–30.
228. Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, Beja K, Feng F, Youngren J, et al. Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017 Dec 1;109(12).
229. 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 May;63(5):920–6.
230. Chakraborty G, Armenia J, Mazzu YZ, Nandakumar S, Stopsack KH, Atiq MO, et al. Significance of BRCA2 and RB1 Co-loss in Aggressive Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res.* 2020 Apr 15;26(8):2047–64.
231. Deek MP, Van der Eecken K, Phillips R, Parikh NR, Isaacsson Velho P, Lotan TL, et al. The Mutational Landscape of Metastatic Castration-sensitive Prostate Cancer: The Spectrum Theory Revisited. *Eur Urol.* 2021 Nov;80(5):632–40.
232. Gayther SA, Mangion J, Russell P, Seal S, Barfoot R, Ponder BA, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):103–5.
233. Samaratunga H, Delahunt B, Egevad L, Srigley JR, Billis A, Bostwick DG, et al. Intraductal carcinoma of the prostate is an aggressive form of invasive carcinoma and should be graded. *Pathology.* 2020 Feb;52(2):192–6.
234. Elfandy H, Armenia J, Pederzoli F, Pullman E, Pertega-Gomes N, Schultz N, et al. Genetic and Epigenetic Determinants of Aggressiveness in Cribriform Carcinoma of the Prostate. *Mol Cancer Res.* 2019 Feb;17(2):446–56.
235. 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 Aug;29(8):904–14.

236. 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 Apr 1;130(4):1743–51.

ARTÍCULOS



original report

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

Elena Castro, MD, PhD^{1,2}; Nuria Romero-Laorden, MD, PhD^{1,3}; Angela del Pozo, PhD⁴; Rebeca Lozano, MD^{1,5}; Ana Medina, MD⁶; Javier Puente, MD, PhD⁷; Josep Maria Piulats, MD, PhD⁸; David Lorente, MD⁹; María Isabel Saez, MD^{5,10}; Rafael Morales-Barrera, MD¹¹; Enrique Gonzalez-Billalabeitia, MD, PhD¹²; Ylenia Cendón, MSc^{1,13}; Iciar García-Carbonero, MD¹⁴; Pablo Borrega, MD¹⁵; M. José Mendez Vidal, MD¹⁶; Alvaro Montesa, MD^{5,10}; Paz Nombela, MSc¹; Eva Fernández-Parra, MD¹⁷; Aránzazu Gonzalez del Alba, MD¹⁸; José Carlos Villa-Guzmán, MD¹⁹; Kristina Ibáñez, PhD⁴; Alejo Rodríguez-Vida, MD, PhD²⁰; Lorena Magraner-Pardo, MSc¹; Begoña Perez-Valderrama, MD²¹; Elena Vallespín, PhD⁴; Enrique Gallardo, MD²²; Sergio Vazquez, MD²³; Colin C. Pritchard, MD, PhD²⁴; Pablo Lapunzina, MD, PhD⁴; and David Olmos, MD, PhD^{1,5}

abstract

PURPOSE Germline mutations in DNA damage repair (DDR) genes are identified in a significant proportion of patients with metastatic prostate cancer, but the clinical implications of these genes remain unclear. This prospective multicenter cohort study evaluated the prevalence and effect of germline DDR (gDDR) mutations on metastatic castration-resistance prostate cancer (mCRPC) outcomes.

PATIENTS AND METHODS Unselected patients were enrolled at diagnosis of mCRPC and were screened for gDDR mutations in 107 genes. The primary aim was to assess the impact of *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* germline mutations on cause-specific survival (CSS) from diagnosis of mCRPC. Secondary aims included the association of gDDR subgroups with response outcomes for mCRPC treatments. Combined progression-free survival from the first systemic therapy (PFS) until progression on the second systemic therapy (PFS2) was also explored.

RESULTS We identified 68 carriers (16.2%) of 419 eligible patients, including 14 with *BRCA2*, eight with *ATM*, four with *BRCA1*, and none with *PALB2* mutations. The study did not reach its primary end point, because the difference in CSS between *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* carriers and noncarriers was not statistically significant (23.3 v 33.2 months; $P = .264$). CSS was halved in germline *BRCA2* (g*BRCA2*) carriers (17.4 v 33.2 months; $P = .027$), and g*BRCA2* mutations were identified as an independent prognostic factor for CCS (hazard ratio [HR], 2.11; $P = .033$). Significant interactions between g*BRCA2* status and treatment type (androgen signaling inhibitor v taxane therapy) were observed (CSS adjusted $P = .014$; PFS2 adjusted $P = .005$). CSS (24.0 v 17.0 months) and PFS2 (18.9 v 8.6 months) were greater in g*BRCA2* carriers treated in first line with abiraterone or enzalutamide compared with taxanes. Clinical outcomes did not differ by treatment type in noncarriers.

CONCLUSION g*BRCA2* mutations have a deleterious impact on mCRPC outcomes that may be affected by the first line of treatment used. Determination of g*BRCA2* status may be of assistance for the selection of the initial treatment in mCRPC. Nonetheless, confirmatory studies are required before these results can support a change in clinical practice.

J Clin Oncol 37:490-503. © 2019 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Inherited mutations in several genes involved in DNA damage repair (DDR) have been reported to predispose men to prostate cancer¹⁻⁴; these include mutations in *BRCA2*, the genetic event that confers the greatest risk of the disease.⁵ Recent next-generation sequencing studies have revealed that germline deleterious mutations in DDR genes are present in 8% to 12% of patients with metastatic prostate cancer.⁶⁻⁸ In a retrospective multi-institutional pooled analysis by

Pritchard et al,⁷ the most frequently mutated genes were *BRCA2* (5.3%), *CHEK2* (2%), *ATM* (1.6%), and *BRCA1* (0.9%). Mutations in the other 16 genes analyzed accounted for less than 0.5% of cases. A prevalence of 12% is significantly higher than that reported in localized prostate cancer (5%) or in the general population (3%),^{7,9} which suggests an association with aggressive disease. In fact, germline mutations in *BRCA2* seem to be an independent poor prognostic factor for localized disease associated with shorter metastasis-free survival and cause-specific

ASSOCIATED CONTENT

Appendix

Data Supplements

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Accepted on October 31, 2018 and published at jco.org on January 9, 2019; DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00358>

A complete list of the PROREPAIR-B investigators is provided in the Appendix.

ASCO

490 Volume 37, Issue 6

Journal of Clinical Oncology®

Downloaded from ascopubs.org by 80.29.193.187 on April 26, 2023 from 080.029.193.187
Copyright © 2023 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.

survival (CSS).^{10,11} On the basis of this evidence, updated National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines now recommend germline *BRCA1/BRCA2* testing in all patients with metastatic prostate cancer.¹² The prognostic implications of non-*BRCA2* DDR defects are less well established. Nonetheless, both germline and somatic DDR defects have been identified as potential predictive biomarkers for platinum-based chemotherapy and poly-ADP ribose polymerase (PARP) inhibitors.¹³⁻¹⁵ Despite promising results with these drugs, resistance eventually occurs,^{16,17} and the data about the impact of DDR defects on the response to currently approved therapies for metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) are limited and conflicting.^{8,18-23}

As a result of the recommendation for germline screening and the implementation of sequencing panels in clinical practice to seek actionable genetic aberrations, the number of patients with germline DNA repair defects is likely to increase in the near future, so there is a pressing need for a better understanding of the implications of DDR defects on the prognosis and treatment of patients with mCRPC.

PATIENTS AND METHODS

Study Design and Patients

PROREPAIR-B (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03075735) is a multicenter prospective cohort study that involved 38 sites (Appendix, online only). Its primary aim was to assess the impact of *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, and *PALB2* germline mutations on CSS from diagnosis of mCRPC and to estimate the prevalence of germline DDR mutations (gDDR) in this population. Secondary end points included the analysis of the impact of gDDR mutations according to three groups—*ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2*; *BRCA2* only; and all gDDR carriers—on CSS, time to PSA progression (TTPP), progression-free survival (PFS), prostate-specific antigen (PSA), and radiographic response rates according to treatment line and by treatment type (androgen signaling inhibitor [ASI] or taxane). The study was granted approval by the Spanish regulatory authorities and by local institutional review boards at the participating sites.

Patients with histologically confirmed prostate cancer and unknown mutational status were enrolled at the time of metastatic castration-resistant diagnosis and observed until death. Patients had to be eligible to start a firstline treatment with a survival-prolonging therapy (SPT) within 6 months of castration resistance. The Appendix (online only) provides a complete list of inclusion and exclusion criteria. All patients provided informed consent at study entry.

Study Procedures

A baseline imaging (computed tomography [CT]/magnetic resonance imaging, and bone scan) evaluation within 6 weeks and a complete full blood count and biochemistry, including PSA and testosterone within 2 weeks of study

entry, were required. A 5-mL blood sample was drawn at study entry for germline DNA extraction. All treatments were at the discretion of the treating physicians and were not dictated by the study. Responses and progression were evaluated according to the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 2 (PCWG2)²⁴ or defined by protocol (Appendix).

Germline Variants Analyses

Sequencing libraries were generated from germline DNA using a custom NimbleGen SeqCap XL Target Enrichment (Roche, Pleasanton, CA) panel and read using an Illumina NexSEquation 500 platform (Illumina, San Diego, CA). On average 2 to 3 million 100-bp reads with a mean coverage of greater than $\times 150$ for each sample were obtained. Then, sequencing files were processed according to the best practices proposed by the Genome Analysis Toolkit (GATK) and then filtered and annotated using ANNOVAR²⁵ and ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) records. A review panel blinded to patient information classified pathogenic variants using ClinVar annotations and the guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics.²⁶ The Exome Aggregation Consortium (ExAC)²⁷ noncancer data ($n = 53,105$) and CIBERER Spanish Variant Server (CSVS; <http://csvs.babelomics.org/>; $n = 1,551$) populations were filtered and reviewed using the same criteria to establish the frequency of pathogenic variants in the noncancer population for the analyzed DDR genes in the study. All variants identified as pathogenic were validated using multicapillary electrophoresis, polymerase chain reaction, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), and/or the BROCA panel (University of Washington Laboratory of Medicine, Seattle, WA; <http://tests.labmed.washington.edu/BROCA>).

Sample Size Calculation and Statistical Analyses

The study statistical design was based on PROREPAIR-B primary endpoint, which was based on our previous report of the association of *BRCA1* and *BRCA2* mutations with higher metastatic spread and shorter CSS.¹⁰ Sample size was calculated using the method proposed by Rubinstein et al²⁸ and assumed a prevalence of germline mutations in *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, and *PALB2* of 5% or greater in patients with mCRPC; a median CSS of 30 months in the noncarriers group, and a hazard ratio (HR) for CSS from mCRPC of 3.0 or greater in *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* carriers versus noncarriers. To demonstrate our hypothesis, with an α of .05 and a β of .20, the study required enrollment of at least 408 patients to observe 171 or more prostate cancer-related deaths over an enrollment period of 30 months and a minimum follow-up of 8 months.

Response rates, including PSA decline of 50% or greater (PSA_{50}) and objective radiographic responses (ORRs), in addition to time-to-event end points (ie, CSS, TTPP, and PFS) were defined by protocol or PCWG2²⁴ criteria (Appendix). All times to events were assessed by means of the

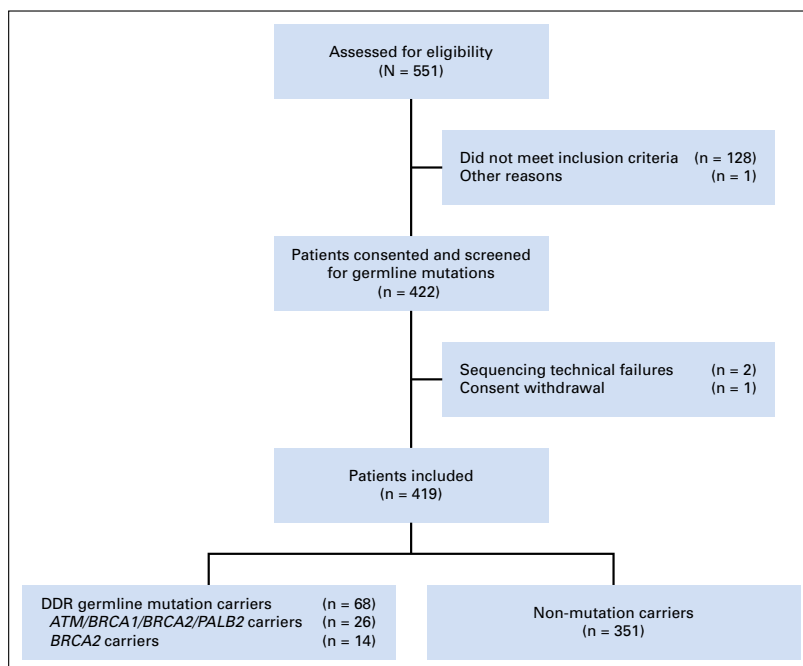


FIG 1. Diagram to illustrate the participants' flow in the PROREPAIR-B (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03075735) study. DDR, DNA damage repair.

Kaplan-Meier method, and the survival curves were compared using a log-rank test. Univariable and multivariable HRs were calculated using Cox proportional hazards models. All *P* values were two sided. Statistical Package for the Social Sciences for Windows version 19 (SPSS, Chicago, IL) and R version 3.3.3 programs were used for the statistical analysis. Data collection cutoff for these analyses was October 31, 2017, when the median follow-up from mCRPC was 40 months and 253 prostate cancer–related deaths had occurred.

RESULTS

Between January 2013 and April 2016, 419 eligible patients from 38 institutions were included (Fig 1). Of them, 98% were white with Spanish ancestry. At prostate cancer diagnosis median age of participants was 66.2 years (range 40.8 to 92.1) and half of them (48.2%) already had metastatic disease. (Table 1).

Germline DNA-Repair Gene Mutations and Familial Cancer History

Twenty-six patients (6.2%) carried a deleterious germline mutation in *BRCA2* (n = 14), *ATM* (n = 8), or *BRCA1* (n = 4). No mutations in *PALB2* were identified. When all 107 DDR genes screened were considered (Fig 2A), 16.2% of patients harbored a pathogenic or likely pathogenic mutation (Fig 2B; Appendix Table A2, online only; Fig A1).

The prevalence of *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* mutations was significantly higher in mCRPC than in CSVS (6.2% v 0.7%; *P* < .001) and ExAC (6.2% v 0.9%; *P* < .001) populations. The odds ratios (ORs) for carrier status in mCRPC compared with Spanish and global noncancer populations were substantially increased for several DDR genes (Fig 2C; Appendix Table A2), including *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, and *MRE11A*. The ORs for germline mutations in DDR genes in mCRPC compared with ExAC and CSVS were 1.4 (95% CI, 1.1 to 1.8; *P* = .021) and 3.2 (95% CI, 2.3 to 4.5; *P* < .001), respectively.

At study entry, 96 patients (22.9%) reported a family history of cancer that was significantly more common in gDDR carriers than in noncarriers (60.3% v 16.0%; *P* < .001; Appendix Fig A2, online only). Of all carriers, those with *BRCA2* mutations had the greatest association with a family history of cancer (85.7% v 20.7%; *P* < .001). Breast and ovarian were the most frequent tumor types among the relatives of gDDR-carrier patients (28.0%). Thirty-nine patients reported a first- or second-degree relative with prostate cancer (17.6% of gDDR carriers v 7.7% of non-carriers; *P* = .019).

Characteristics of Carriers and Noncarriers at Diagnosis of mCRPC

The median time from the initiation of continuous androgen-deprivation therapy for recurrent or metastatic disease to castration resistance was significantly shorter for

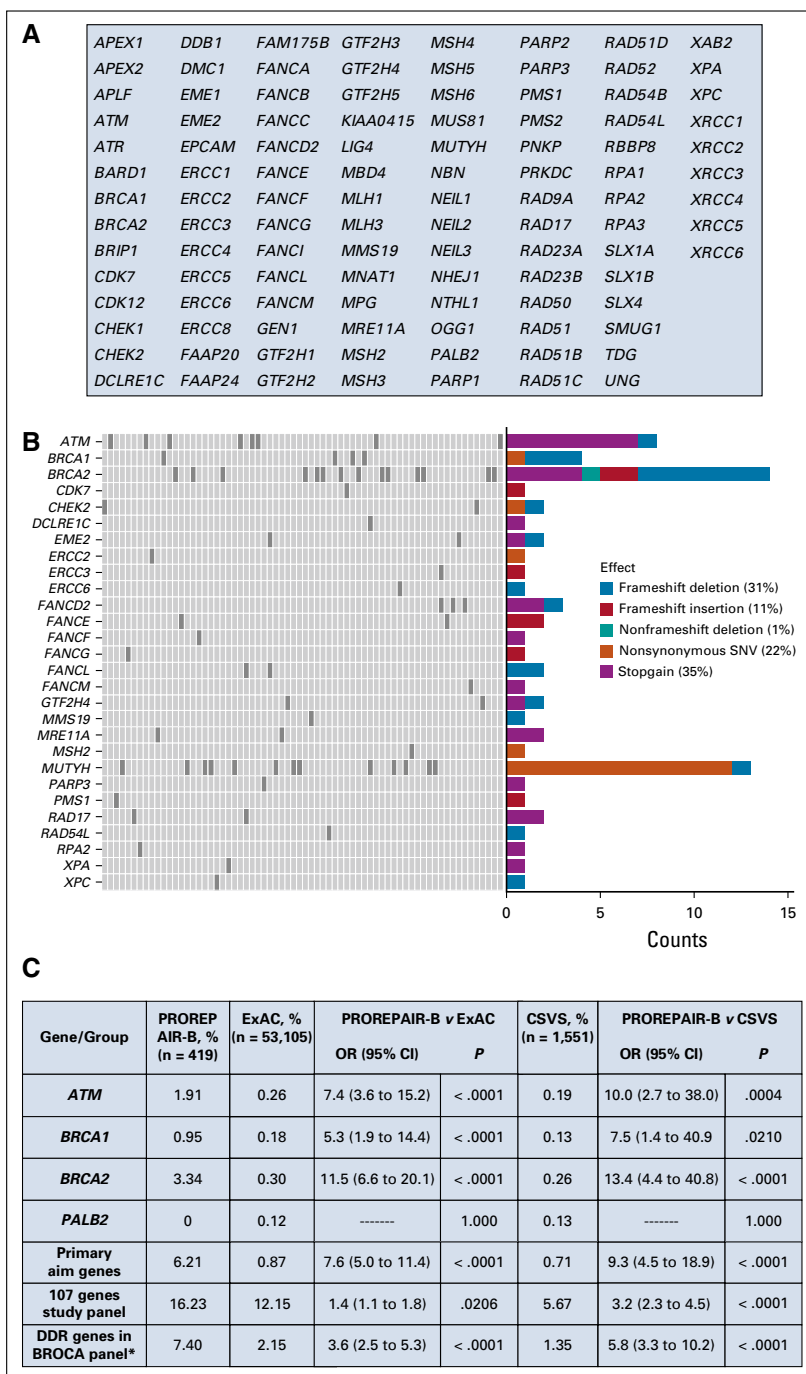


FIG 2. Prevalence of pathogenic variants in DNA damage repair (DDR) genes in unselected patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). (A) Full list of the DDR genes screened in the PROREPAIR-B (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03075735) study. (B) Distribution of the pathogenic/likely pathogenic mutations identified in the study. (C) Prevalence of deleterious germline mutations in the DDR genes analyzed in metastatic prostate cancer compared with noncancer populations—the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and the CIBERER Spanish Variant Server (CSVS) populations. (*) ATM, ATR, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, FAM175A, GEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, XRCC2. OR, odds ratio; SNV, single-nucleotide variant.

TABLE 1. Patient Characteristics at the Time of Metastatic Castration-Resistant Diagnosis and Summary of the Treatments Administered for mCRPC to the Patients in the Different Carrier Groups.

Characteristic	All Patients	Germline Mutation Carriers			
		Noncarriers	ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2	BRCA2 Carriers	gDDR+
Median age at diagnosis, years (range)	66.2 (40.8-92.1)	66.2 (40.8-92.1)	64.2 (50-85.9)	64.2 (50-73.3)	65.9 (48-85.9)
Gleason histology grade					
6-7	167 (40.3)	144 (41)	9 (34.6)	4 (28.6)	25 (36.8)
≥ 8	247 (59.7)	207 (59)	17 (65.4)	10 (71.4)	43 (63.2)
Stage at diagnosis					
M0	217 (51.8)	189 (53.8)	13 (50)	8 (57.1)	28 (42.2)
M1	202 (48.2)	162 (46.2)	13 (50)	6 (42.9)	40 (58.8)
Median time from continuous ADT to mCRPC, months, (range)	28.1 (24.4-31.7)	28.4 (24.2-32.6)	18.6 (10.6-26.6)	13.2 (3.5-23.0)	22.8 (16.1-29.5)
Median age at mCRPC, years (range)	71.4 (46.6-93.8)	71.8 (46.6-93.8)	67.1 (52.1-86.6)	68.9 (52.1-77.6)	69.3 (50.7-86.6)
Median PSA at mCRPC, ng/dL (range)	27.5 (0.03-1,980)	27.5 (0.03-1,980)	29.4 (2.20-580)	51.6 (2.20-580)	24.8 (0.9-756)
Progression to mCRPC					
Only PSA	256 (61.1)	220 (62.7)	10 (38.5)	4 (28.6)	36 (52.9)
Radiographic ± PSA	163 (38.9)	131 (37.3)	16 (61.5)	10 (71.4)	32 (47.1)
Metastases					
Nodal	197 (47)	166 (47.3)	15 (57.7)	9 (64.3)	31 (45.6)
Bone	349 (83.3)	289 (82.3)	24 (92.3)	13 (92.9)	60 (88.2)
Visceral	42 (10)	32 (9.1)	3 (11.5)	3 (21.4)	10 (14.7)
ECOG performance status					
0	203 (48.4)	178 (50.7)	8 (30.8)	4 (28.6)	25 (36.8)
1	184 (43.9)	144 (41)	15 (57.7)	7 (50)	40 (58.8)
2	32 (7.6)	29 (8.3)	3 (11.5)	3 (21.4)	3 (4.4)
Elevated ALP (> ULN)	179 (42.7)	150 (42.7)	13 (50)	9 (64.3)	29 (42.6)
Elevated LDH (> ULN)	137 (33.1)	114 (32.9)	10 (40)	6 (42.9)	23 (34.3)
Hemoglobin < 10 g/dL	20 (4.9)	18 (5.1)	2 (7.7)	2 (14.3)	2 (2.9)
Albumin < 3.5 g/dL	27 (6.6)	23 (6.6)	1 (3.8)	1 (7.1)	4 (6.1)
Treatment lines for mCRPC					

(continued on following page)

TABLE 1. Patient Characteristics at the Time of Metastatic Castration-Resistant Diagnosis and Summary of the Treatments Administered for mCRPC to the Patients in the Different Carrier Groups. (continued)

Characteristic	All Patients	Noncarriers	Germline Mutation Carriers				P	gDDR+	P
			ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2	BRCA2 Carriers	P	gDDR+			
Total No. of lines	3 (1-9)	3 (1-9)	3 (1-6)	3 (1-5)	.5696	.3831	3 (1-7)	.4791	
No. of SPT lines	2 (1-5)	2 (1-5)	2 (1-5)	2 (1-3)	.8614	.7931	2 (1-5)	.5630	
SPTs									
Abiraterone	302 (72.1)	257 (73.2)	16 (61.5)	9 (64.3)	.2161	.5475	45 (66.2)	.2360	
Enzalutamide	126 (30.1)	107 (30.5)	8 (30.8)	4 (28.6)	.9361	1.000	19 (27.9)	.6755	
Docetaxel	316 (75.4)	265 (75.5)	21 (80.8)	12 (85.7)	.5128	.3628	51 (75)	.9303	
Cabazitaxel	132 (31.5)	107 (30.5)	10 (38.5)	4 (28.6)	.4303	1.000	25 (36.8)	.3075	
Radium-223	69 (16.5)	61 (17.4)	3 (11.5)	1 (7.1)	.5959	.4827	8 (11.8)	.2532	
Other treatments									
Ketoconazole	16 (3.8)	15 (4.3)	0	0	.6127	1.000	1 (1.5)	.4873	
Corticosteroids	58 (13.8)	49 (14)	2 (7.7)	0	.5566	.2335	9 (13.2)	.8741	
Estrogens	14 (3.3)	9 (2.6)	1 (3.8)	0	.5981	1.000	5 (7.4)	.0594	
Cyclophosphamide	47 (11.2)	38 (10.8)	4(15.4)	2 (14.3)	.5161	.6630	9 (13.2)	.5645	
Mitoxantrone	25 (6)	23 (6.6)	1 (3.8)	0	1.000	1.000	2 (2.9)	.3997	
Platinum-based chemotherapy	24 (5.7)	19 (5.4)	4(15.4)	2 (14.3)	.0527	.1879	5 (7.4)	.5666	
PARP inhibitors	4 (1)	4 (1.1)	0	0	1.000	1.000	0	1.000	

NOTE: Data presented as No. (%) unless otherwise indicated. Abbreviations: ADT, androgen deprivation therapy; ALP, alkaline phosphatase; DDR, DNA damage repair; gDDR+, germline DNA damage repair-positive; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer; SPT, survival-prolonging therapies; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PSA, prostate-specific antigen; ULN, upper limit of normal.

gDDR carriers than noncarriers (22.8 v 28.4 months; $P = .007$), particularly for *BRCA2* carriers versus noncarriers (22.8 v 13.2 months; $P = .048$). Progression to mCRPC in the *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* group was frequently accompanied by radiographic progression (61.5%; $P = .015$ v noncarriers), particularly in *BRCA2* carriers (71.4%; $P = .011$ v noncarriers). Other baseline characteristics at mCRPC were similar in the carriers and noncarriers groups (Table 1). No differences in the exposure to treatments were observed between groups. Remarkably, only 7.4% of carriers and 5.4% noncarriers received platinum-based chemotherapy ($P = .567$). Just four patients (1.1%), all of them noncarriers, received a PARP inhibitor in the context of clinical trials.

CSS From mCRPC

Median CSS was 10 months shorter in *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* carriers than in noncarriers (Fig 3A), yet the difference was not significant (23.3 v 33.2 months; $P = .264$; HR, 1.32; 95% CI, 0.81 to 2.17), and the study did not meet the prespecified primary end point. Likewise, there were no differences in CSS when all gDDR carrier patients were analyzed ($P = .646$; Fig 3C). Conversely, *BRCA2* carriers showed a CSS that was approximately halved compared with noncarriers, which reached statistical significance (median, 17.4 v 33.2 months; $P = .027$; HR, 2.10; 95% CI, 1.07 to 4.10; Fig 3B). The difference in CSS was also significant when *BRCA2* carriers were compared with other non-*BRCA2* gDDR carriers (median, 33.8 months; $P = .048$). Multivariable analyses identified *BRCA2* as an independent prognostic factor for CSS in mCRPC (HR, 2.11; 95% CI, 1.06 to 4.18).

Outcomes From First ASI and First Taxane

At the time of data cutoff, 365 patients had received at least one ASI, most of them as first (59.5%) or second (32.6%) SPT. A taxane was given to 326 patients in this setting, mostly as first SPT (60.4%), and docetaxel was the taxane of choice for 96.3%. Overall, nonsignificant differences in PSA₅₀ responses, ORR, TTTP, PFS, and CSS were observed between *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2*, gDDR carrier, and noncarrier groups when treated either with the first ASI or the first taxane. However, shorter median CSS after the first taxane (12.8 v 23.3 months; $P = .015$; HR, 2.23; 95% CI, 1.13 to 4.38), but not after the first ASI (23.3 v 26.2 months; $P = .215$; HR, 1.63; 95% CI, 0.76 to 3.48), was observed in *BRCA2* carriers compared with noncarriers (Table 2). The differences between these two groups in PSA₅₀, ORR, TTTP, and PFS were not significant (Table 2).

Differential Effect of gDDR Carrier Status in Patients Who Received Taxane or ASI as Firstline Treatment

We performed interaction analyses to assess whether the impact of carrier status on CSS was influenced by the first SPT administered. A significant interaction for CSS from firstline treatment between *BRCA2* status and treatment

type was observed in the unadjusted Cox-regression model ($P = .015$), which remained significant ($P = .014$) in an adjusted model that accounted for age; ECOG performance status; PSA; time to mCRPC from androgen-deprivation therapy initiation; and levels of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, albumin, and hemoglobin (Fig 4). Conversely, nonsignificant interactions for CSS were observed between *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* (unadjusted $P = .786$; adjusted $P = .772$) or gDDR carriers (unadjusted $P = .498$; adjusted $P = .909$) and treatment type. Likewise, nonsignificant interactions for PSA₅₀, ORR, TTTP, and PFS were identified between any carrier group and treatment type. When we analyzed the second SPT, a significant interaction between germline *BRCA2* (*gBRCA2*) status and treatment was observed (unadjusted $P = .006$; adjusted $P = .032$; Appendix Fig A3, online only).

Impact of Treatment Sequence in *BRCA2* Carriers

The interactions described above suggested a worse survival for those *BRCA2* carriers who received a taxane as first-SPT and/or an ASI as second-SPT. We then conducted a post hoc analysis to compare CSS and PFS from initiation of the first-SPT to progression to the second-SPT or death (PFS2) according to *BRCA2* status and SPT sequence: ASI-taxane or taxane-ASI. A total of 348 patients were eligible for this analysis, 190 (including 7 *BRCA2*) and 158 (including 7 *BRCA2*) in the ASI-taxane and taxane-ASI sequence, respectively. Patients in the taxane-ASI group were younger ($P < .0001$), with worse ECOG ($P = .0023$), higher PSA ($P = .0071$), and elevated lactate dehydrogenase ($P = .0002$) and alkaline phosphatase ($P = .0102$) than patients in the ASI-taxane group (Appendix Table A3, online only).

We first performed unadjusted interaction analyses between *BRCA2* and treatment sequence that were significant for both CSS ($P = .020$) and PFS2 ($P = .001$). CSS and PFS2 did not differ between *BRCA2* carriers and noncarriers treated with the ASI-taxane sequence (Figs 5A, 5C, 5E). Conversely, *BRCA2* carriers treated with the taxane-ASI sequence had significantly worse CSS (median, 28.4 v 10.7 months; $P < .001$; HR, 4.16; 95% CI, 1.80 to 9.62) and PFS2 (median, 17.1 v 8.6 months; $P < .001$; HR, 8.16; 95% CI, 3.60 to 18.49) than noncarriers who received the same treatment (Figs 5B, 5D, and 5F). Subsequent Cox regression interaction analysis adjusted for variants that differed between both treatment sequences and other significant prognostic factors (Appendix Table A3) were also significant for both CSS (adjusted $P = .015$) and PFS2 (adjusted $P = .005$). *BRCA2* was identified as an independent prognostic factor for CSS (HR, 2.95; 95% CI, 1.22 to 7.15) and PFS2 (HR, 5.50; 95% CI, 2.35 to 12.89) in patients treated with the taxane-ASI sequence (Appendix Table A4, online only).

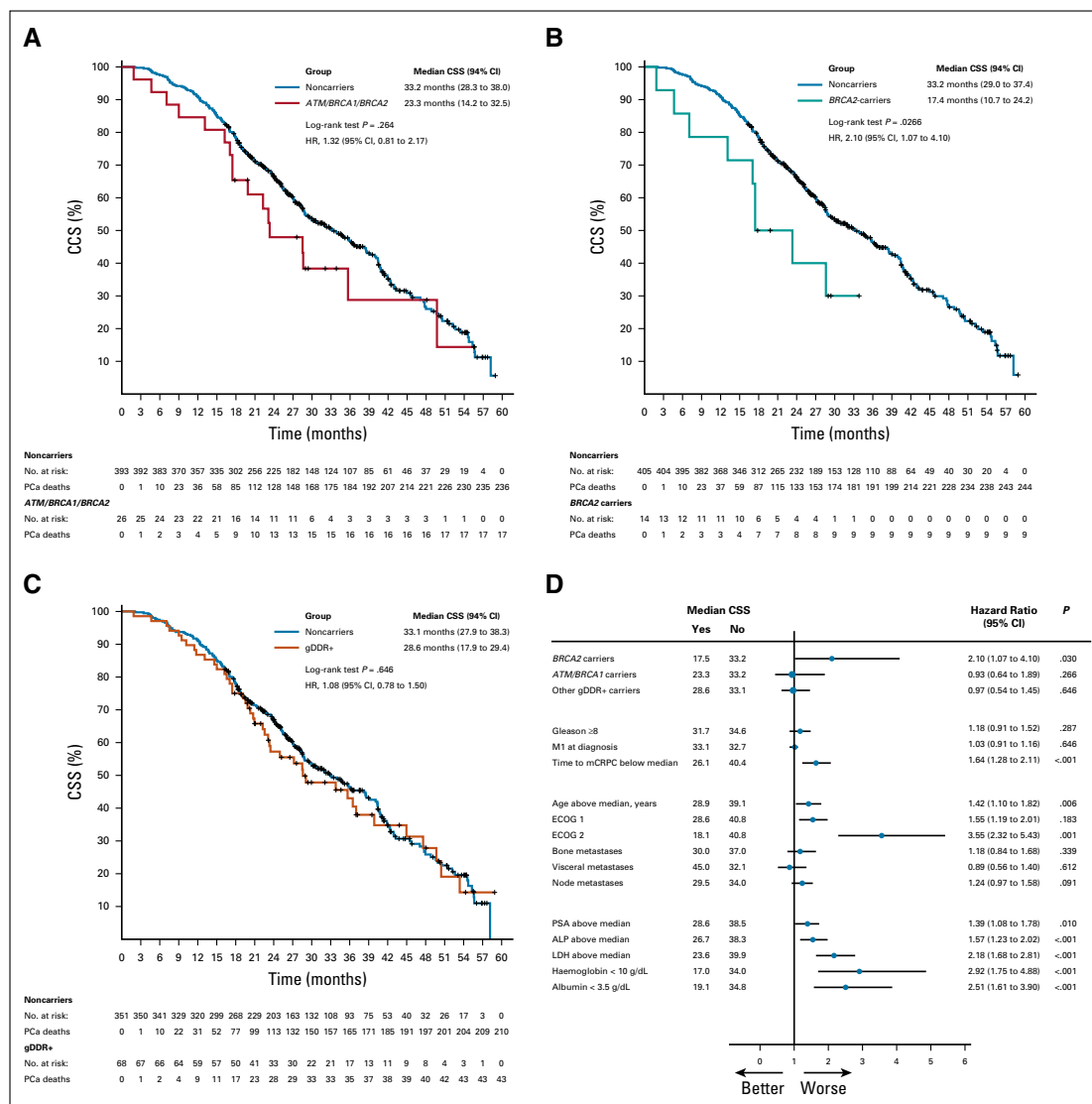


FIG 3. Cause-specific survival (CSS) from diagnosis of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). Kaplan-Meier curves for CSS: (A) *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* versus noncarriers; (B) *BRCA2* versus noncarriers; (C) All germline DNA damage repair positive (gDDR+) versus noncarriers. (D) Forest plot of univariable hazard ratios (HRs) for CSS. ALP, alkaline phosphatase; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen.

DISCUSSION

To our knowledge, PROREPAIR-B is the first prospective study designed to assess the prevalence and impact of gDDR mutations in the outcomes of patients with mCRPC. It is also likely the last prospective report on the survival and treatment responses of patients with mCRPC who have gDDR mutations but who have not been exposed to PARPis and platinum-based chemotherapy. Although the primary

end point of the study (CSS in *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* carriers v noncarriers) was not met (no significant 10-month difference), we were able to identify *gBRCA2* mutations as an independent prognostic factor for CSS in the mCRPC setting. The results also suggest that treatment sequence may be relevant for *gBRCA2* carriers.

In PROREPAIR-B, we screened unselected patients with mCRPC and identified 16.2% of them as gDDR carriers—

TABLE 2. Outcomes of Patients by Carrier Group After Treatment With the First Taxane or the First ASI Given for mCRPC.

Outcome	No. of Patients	ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2			BRCA2			gDDR		
		Carriers	Noncarriers	P	Carriers	Noncarriers	P	Carriers	Noncarriers	P
First taxane										
Median (95% CI) CSS, months	326	16.9 (10.5 to 23.2)	23.2 (19.6 to 26.7)	.7715	12.8 (9.4 to 16.3)	23.2 (19.6 to 26.7)	.0152	24.0 (20.5 to 27.5)	26.3 (23.7 to 28.8)	.7702
Median (95% CI) TTPP, months	308	5.5 (0.5 to 10.5)	6.2 (5.7 to 6.7)	.6114	5.0 (3.3 to 6.7)	6.2 (5.8 to 6.6)	.1622	6.1 (4.4 to 7.9)	6.2 (5.7 to 6.7)	.8486
Median (95% CI) PFS, months	326	7.8 (1.7 to 14.0)	7.4 (6.8 to 7.8)	.6847	4.5 (1.5 to 7.5)	7.4 (6.8 to 7.9)	.0875	7.5 (5.87 to 9.2)	7.3 (6.7 to 7.9)	.9663
PSA ₅₀ response rate, % (95% CI)	295	52.9 (29.2 to 76.6)	49.6 (43.8 to 55.6)	.7920	45.5 (16.0 to 74.9)	50.0 (44.2 to 55.9)	.7670	42.2 (27.8 to 56.7)	51.2 (45 to 57.4)	.2678
ORR rate, % (95% CI)	286	30.0 (10.0 to 40.4)	14.7 (10.4 to 18.9)	.1026	36.4 (7.9 to 64.8)	14.9 (10.7 to 19.1)	.0764	25.0 (12.8 to 37.25)	13.9 (9.5 to 18.3)	.0532
First ASI										
Median (95% CI) CSS, months	365	23.3 (15.4 to 31.3)	26.2 (23.6 to 28.7)	.1302	23.3 (7.7 to 38.9)	26.2 (23.7 to 28.6)	.2153	24.0 (20.5 to 27.5)	26.3 (23.7 to 28.9)	.3543
Median (95% CI) TTPP, months	356	4.6 (1.5 to 7.6)	7.0 (6.2 to 7.7)	.1710	3.0 (2.7 to 3.3)	7.0 (6.2 to 7.8)	.1177	7.0 (5.7 to 8.2)	6.9 (6.2 to 7.8)	.7655
Median (95% CI) PFS, months	364	8.1 (4.7 to 11.4)	9.2 (8.1 to 10.3)	.5887	4.3 (1.0 to 7.6)	9.2 (8.1 to 10.3)	.0636	8.1 (6.9 to 9.3)	9.2 (8.1 to 10.3)	.5887
PSA ₅₀ response rate, % (95% CI)	337	44.4 (21.5 to 67.4)	53 (47.5 to 58.5)	.4810	30 (1.6 to 58.4)	53.2 (47.8 to 58.6)	.2020	53.8 (40.3 to 67.4)	52.3 (46.5 to 58.1)	.8353
ORR rate, % (95% CI)	329	9.5 (0 to 2.7)	10.1 (6.7 to 22.2)	1.000	16.7 (0 to 37.8)	9.8 (6.5 to 13.1)	.3430	11.1 (2.7 to 19.5)	9.8 (6.3 to 13.3)	.7725

Abbreviations: ASI, androgen signaling inhibitor; CSS, cause-specific survival; gDDR, germline mutations in the 107 DNA damage response and repair genes studied; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer; ORR, objective radiographic response, defined as the sum of partial responses and complete responses (objective responses) according to RECIST version 1.1 and to the Prostate Clinical Trials Working Group (PCWG2); PFS, progression-free survival; PSA₅₀, prostate-specific antigen decline of 50% or more from baseline defined according to PCWG2 criteria; TTPP, time to prostate-specific antigen progression.

Role of Inherited DNA Repair Defects in Advanced Prostate Cancer

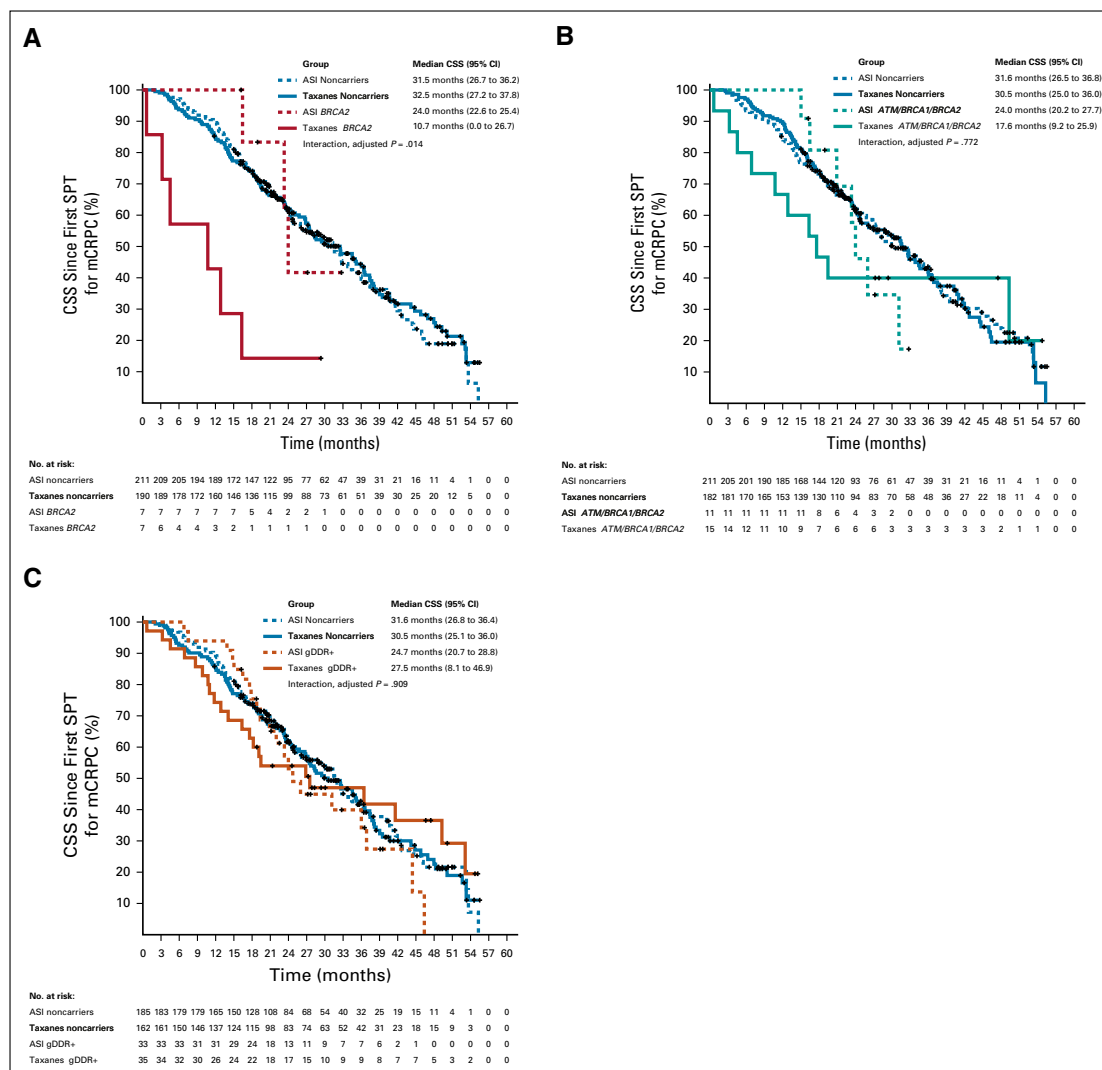
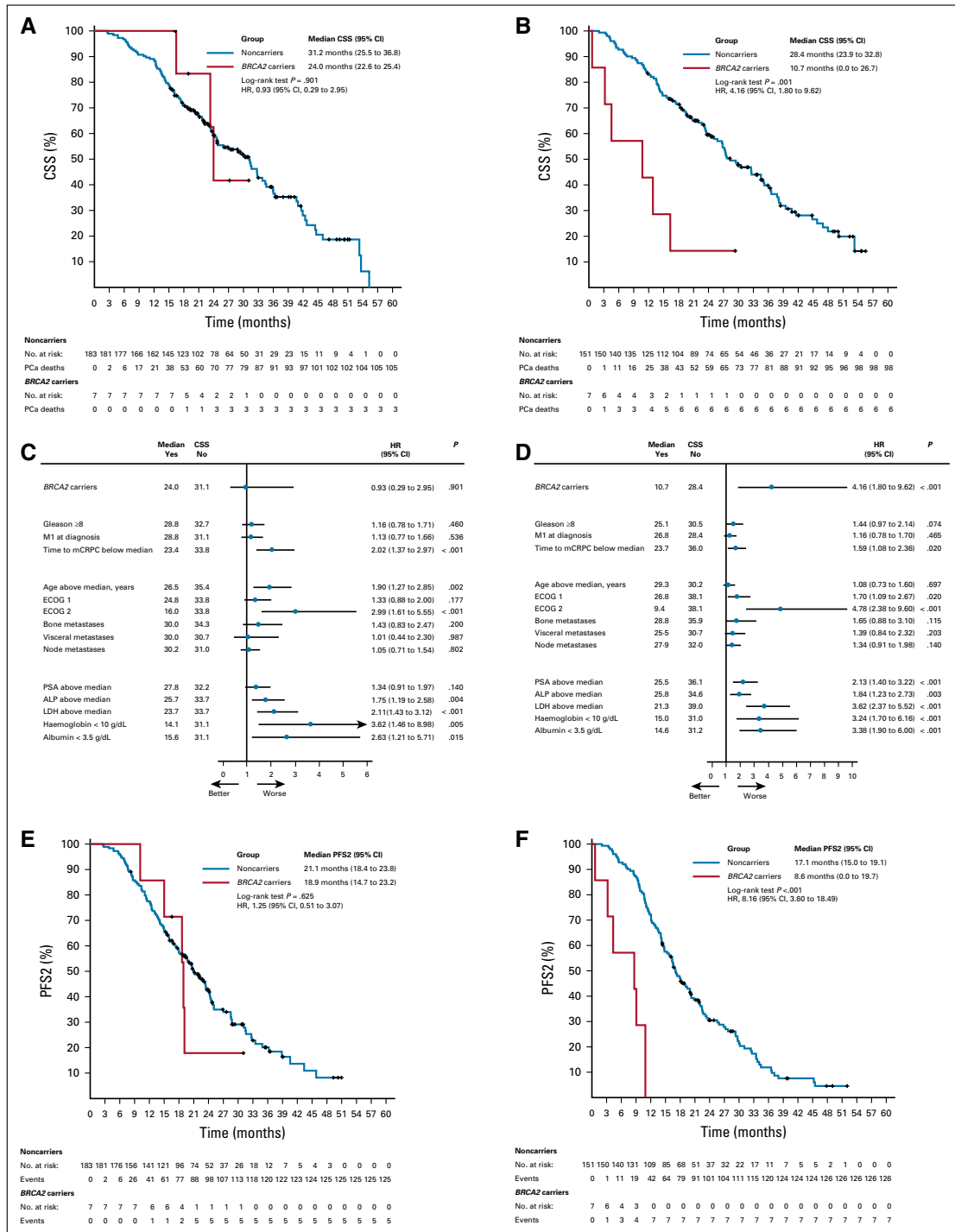


FIG 4. Cause-specific survival (CSS) since firstline survival-prolonging therapy (SPT) and interaction analysis between carrier status and treatment type. Kaplan-Meier analysis in 415 patients—218 treated with androgen signaling inhibitor (ASI) and 197 treated with taxanes ($n = 4$ received Ra-223 and were excluded), separated according to carrier subgroups: (A) germline *BRCA2* mutant versus non-*BRCA2* carriers; a positive interaction between *BRCA2* carrier status and treatment type was observed (adjusted $P = .014$). No significant interactions were observed between treatment type and the following: (B) germline *ATM/BRCA1/BRCA2* mutant versus non-*ATM/BRCA1/BRCA2* carriers (adjusted $P = .772$) and (C) all germline DNA damage repair (gDDR)—mutant versus non-gDDR carriers (adjusted $P = .909$). Factors included together with the carrier status in the adjusted interaction Cox regression model were those significantly associated with CSS: median time to metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) since androgen-deprivation therapy (ADT), median prostate-specific antigen (PSA), ECOG performance status, albumin, lactate dehydrogenase (LDH), and alkaline phosphatase. HR, hazard ratio.

significantly higher prevalence than that in noncancer populations. Despite the general acceptance of ExAC as a control population, the Spanish population remains underrepresented; therefore, we also used CSVS as a control.

Still, both are limited by the inclusion of exome-only data and variant calling. Almost half of the carriers harbored a mutation in any of the 18 genes associated to cancer predisposition syndromes that our panel has in common



with the 20 analyzed by Pritchard et al,⁷ who found a prevalence of 11.7% compared with 7.4% in our series. In the series by Pritchard et al,⁷ Ashkenazi founder mutations *BRCA1* c.5266dupC and *BRCA2* c.5946delT accounted for 66% and 24% of the mutations identified in *BRCA1* and *BRCA2*, respectively. Similarly, the Eastern European founder mutation *CHEK2* p.1100del represented 50% of all mutations in *CHEK2*. These three mutations, which accounted for 22% of all mutations,⁷ are very rare in the Spanish population,^{29,30} and none of our patients carried them. The prevalence of germline mutations is known to vary among populations because of founder mutation effects and other historical and geographic factors.²⁹ *BRCA2* remained the most frequently mutated gene in our population, but it had a lower prevalence (3.3%) than that previously reported (5.3%). The second most commonly mutated gene in our series was *MUTYH* (3.1%). Monoallelic mutations in *MUTYH* are present in 1% to 2% of the European population, but the association with prostate cancer predisposition remains unclear.^{31,32} Prevalence of *ATM* and *PALB2* mutations in our series were 1.9% and 0%, respectively. The first was slightly higher, and the second was slightly lower, than those reported by Pritchard et al,⁷ but both were similar to the prevalence found in Spanish patients with breast cancer.^{33,34} No founder/recurrent mutations in *ATM* or *PALB2* have been described in our population to date.

Evidence reported to date about the impact of gDDR aberrations on the outcomes of patients with mCRPC treated with the available SPTs is conflicting. In PROREPAIR-B, we observed interactions suggesting that the impact of *gBRCA2* on CSS and PFS2 may be modified by treatment type as well as by treatment sequence. Independent of other factors, *BRCA2* carriers have worse outcomes when treated with taxanes as the first SPT but not when they received an ASI as first treatment. These observations may contribute to explain the contradictory results reported to date. Annala et al⁸ analyzed the retrospective data of 176 patients with mCRPC, including 22 gDDR carriers (*BRCA2*; n = 16) and found that the PFS of gDDR carriers on firstline ASI was significantly shorter than that of noncarriers (3.3 v 6.2 months; *P* = .01). Importantly, a higher proportion of gDDR carrier patients (45% v 33% of noncarriers) received a taxane followed by an ASI, a sequence that according to our results could negatively affect *BRCA2* carriers but not noncarriers. In addition, the poor PFS could be related to the high tumor burden in the patients included, as reflected by the high levels of circulating tumor DNA reported (> 30%). We also note that great heterogeneity was

observed in PFS: some gDDR carriers benefited from ASIs for more than 2 years. We also identified some long-time responses among the gDDR carriers in our series, including three *BRCA2* carriers who responded for more than 12 months of response; one benefited from enzalutamide for 32 months. These observations are in line with those of Antonarakis et al,²² who recently reported the outcomes of 172 patients with mCRPC treated with an ASI, including 22 gDDR carriers (*BRCA1*, n = 1; *BRCA2*, n = 5; and *ATM*, n = 3). Only 23% of gDDR carriers and noncarriers received chemotherapy before the ASI. In contrast to Annala et al,⁸ Antonarakis et al²² reported a trend toward a more prolonged PFS in gDDR carriers (13.3 v 10.3 months; *P* = .107) and *ATM/BRCA1/BRCA2* carriers (15 v 10.8 months; *P* = .090) compared with noncarriers. Interestingly, they also identified previous chemotherapy as a factor associated with worse PFS and CSS but did not analyze whether this affected carriers and noncarriers similarly. Finally, in a retrospective series with 330 noncarriers and 60 gDDR carriers (*BRCA2*, n = 37), Mateo et al²¹ found no association between gDDR carrier status and the response to the first ASI or the first taxane. Overall, 73% and 70% of the patients included received a taxane and ASI, respectively, but the treatment sequence was not specified. No differences were observed in CSS between gDDR carriers and noncarriers, (38.4 v 36.0 carriers; *P* = .73), not even for the *BRCA2* subgroup. However, 47% of gDDR carriers received a PARP inhibitor and/or platinum-based chemotherapy, which may have had a confounding effect on survival.

We acknowledge several limitations to this study. First, the prevalence and distribution of gDDR mutations observed in our series may not be extrapolated to other cohorts because of the variability in the prevalence of germline mutations across populations. Additional screening of large cohorts of patients with different genetic backgrounds is required to establish the true frequency of inherited mutations in DDR genes in mCRPC. Second, the evaluation of patient outcomes according to treatment type and sequence is limited by the lack of randomization inherent to an observational study. Because of the small number of carriers treated with each SPT, outliers may have influenced outcomes. Therefore, findings about the impact of treatment sequence in *BRCA2* carriers should be considered only hypothesis generating until validated in larger series. Finally, we did not analyze somatic DDR defects that could be present in a substantial proportion of noncarriers⁶ and could also affect the grade of DDR impairment in gDDR carriers as consequence of the inactivation of the second allele. Neither have we considered other concurrent genomic

FIG 5. Cause-specific survival (CSS) and progression-free survival (PFS) from initiation of the first survival-prolonging therapy (SPT) to progression to the second SPT (PFS2) in *BRCA2* carriers and non-*BRCA2* carriers by treatment sequence. Kaplan-Meier curves for CSS: (A) patients treated with an androgen signaling inhibitor (ASI) followed by a taxane; and (B) patients treated with a taxane followed by an ASI. Forest plot of univariable hazard ratios (HRs) for CSS: (C) ASI-taxane sequence; and (D) taxane-ASI sequence. Kaplan-Meier curves for PFS2: (E) ASI-taxane sequence; and (F) taxane-ASI sequence. ALP, alkaline phosphatase; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; M1, metastases; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer; PCa, prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen.

events^{35,36} or histologies (ie, intraductal)³⁷ that have been associated with poor prostate cancer outcomes and that may be enriched in gDDR carrier-related tumors.

In conclusion, this study confirms *BRCA2* as the most frequently altered DDR gene in unselected patients with mCRPC, although the prevalence and distribution of mutations in DDR genes may vary across populations. Furthermore, we have prospectively demonstrated that g*BRCA2*

mutations are an independent prognostic factor for survival in mCRPC. Finally, these results suggest that the outcomes associated with g*BRCA2* may be modified by the initial treatment type. This observation is based on a small number of patients and requires additional validation before a change in clinical practice is supported. However, if confirmed, g*BRCA2* would be the first genetic biomarker to select an ASI instead of taxanes as the first line of treatment for mCRPC.

AFFILIATIONS

¹Prostate Cancer Clinical Unit, Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain

²Hospital Universitario Quiron, Madrid, Spain

³Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

⁴Institute of Medical and Molecular Genetics, Hospital Universitario La Paz, and CIBERER Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁵CNIO_IBIMA Genitourinary Cancer Research Unit, Institute of Biomedical Research in Málaga, Málaga Spain

⁶Centro Oncológico de Galicia, Coruña, Spain

⁷Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

⁸Institut Català d'Oncologia, Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, Spain

⁹Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

¹⁰Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional de Málaga, Málaga, Spain

¹¹Vall d'Hebron Institute of Oncology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

¹²Hospital Morales Messeguer-IMIB, UCAM, Murcia, Spain

¹³Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

¹⁴Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

¹⁵Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain

¹⁶Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

¹⁷Hospital Universitario de Valme, Seville, Spain

¹⁸Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

¹⁹Hospital General Universitario de Ciudad Real, Ciudad Real, Spain

²⁰Hospital del Mar, Barcelona, Spain

²¹Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

²²Parc Taulí Hospital Universitari, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí I3PT, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Spain.

²³Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, Spain

²⁴University of Washington Medical Center, Seattle, WA

CORRESPONDING AUTHOR

David Olmos, MD, PhD, Spanish National Cancer Research Center, 3, Melchor Fernández Almagro, 28029 Madrid, Spain; e-mail: dolmos@cnio.es.

EQUAL CONTRIBUTION

E.C. and N.R.-L. contributed equally to this work.

PRIOR PRESENTATION

Presented in part at the European Society for Medical Oncology meeting, Madrid, Spain, September 8-12, 2017, and the ASCO Genitourinary Cancer Symposium, San Francisco, CA, February 8-10, 2018.

SUPPORT

Supported by an unrestricted grant from Fundación Cris contra el cancer; three investigator awards from the Prostate Cancer Foundation (C.C.P. [2013], D.O. [2014], and E.C. [2017]); and three grants from Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (No. PI13/01287

and PI16/01565 to D.O. and No. PI15/01471 to P.L.). During the conduct of this study, E.C., D.O., P.N., and L.M.-P. were supported by grants from Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (No. JCI-2014-19129 [E.C.], No. RYC-2015-18625 [D.O.], No. SVP-2013-067937 [P.N.], No. SVP-2014-068895 [L.M.]); D.O. was also funded by a Return fellowship from Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cancer, 2012-2015; N.R.L. and R.L., by grants from Instituto de Salud Carlos III (No. CM14-00200 to N.R.L. and No. CM17-00221 [R.L.]); and Y.C., by a grant from Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (No. FPU15/05126). C.C.P. was supported by a congressional-designated medical research program award (No. CMRP-PC131820).

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST AND DATA AVAILABILITY STATEMENT

Disclosures provided by the authors and data availability statement (if applicable) are available with this article at DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00358>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Elena Castro, Nuria Romero-Laorden, Angela del Pozo, Elena Vallespín, Pablo Lapunzina, David Olmos

Collection and assembly of data: Elena Castro, Nuria Romero-Laorden, Rebeca Lozano, Ana Medina, Javier Puente, Josep Maria Piulats, David Lorente, Maria Isabel Saez, Rafael Morales-Barrera, Enrique Gonzalez-Billalabeitia, Ylenia Cendón, Iciar García-Carbonero, Pablo Borrega, M. José Méndez Vidal, Alvaro Montesa, Eva Fernández-Parra, Aránzazu González del Alba, José Carlos Villa-Guzmán, Aljo Rodríguez-Vida, Lorena Magraner-Pardo, Begoña Perez-Valderrama, Enrique Gallardo, Sergio Vazquez, Pablo Lapunzina, David Olmos

Provision of study material or patients: All authors

Data analysis and interpretation: Elena Castro, Nuria Romero-Laorden, Angela del Pozo, Rebeca Lozano, David Lorente, Enrique González-Billalabeitia, Ylenia Cendón, Paz Nombela, Kristina Ibañez, Lorena Magraner-Pardo, Colin C. Pritchard, David Olmos

Administrative support: Elena Castro, Nuria Romero-Laorden, Rebeca Lozano, David Olmos

Financial support: Elena Castro, Pablo Lapunzina, David Olmos

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

ACKNOWLEDGMENT

We thank all of the patients, clinicians, and research assistants involved in the PROREPAIR-B study. We would like to acknowledge the teams at the Spanish National Cancer Center (CNIO) and the Institute of Biomedical Research in Málaga (IBIMA), especially Leticia Rivera and Gala Grau (IBIMA) for their dedication as coordinators of the study-monitoring team and logistics, Antonio López and Berta Nasarre (CNIO) for support in the regulatory process and contracts set-up in all participating centers, María Isabel Pacheco and Teresa Garcés for the technical support and sample handling at CNIO Prostate cancer laboratory, and Alicia Barroso, Mercedes Robledo, and Orlando

Role of Inherited DNA Repair Defects in Advanced Prostate Cancer

Dominguez (CNIO) for technical support with MLPA and multicapillary sequencing. We also thank the sequencing facility at Instituto de Genética Médica y Molecular, the genomics core facility at CNIO, and the Clinical Molecular Genetics Laboratory at the University of Washington Medical Center.

REFERENCES

1. Dombornowsky SL, Weischer M, Allin KH, et al: Risk of cancer by *ATM* missense mutations in the general population. *J Clin Oncol* 26:3057-3062, 2008
2. Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, et al: A recurrent mutation in *PALB2* in Finnish cancer families. *Nature* 446:316-319, 2007
3. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, et al: Germline *BRCA1* mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* 106:1697-1701, 2012
4. Eeles R, Goh C, Castro E, et al: The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* 11:18-31, 2014
5. Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Saunders E, et al: *BRCA2* is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: Implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br J Cancer* 105:1230-1234, 2011
6. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al: Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 162:454, 2015
7. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, et al: Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 375:443-453, 2016
8. Annala M, Struss WJ, Warner EW, et al: Treatment outcomes and tumor loss of heterozygosity in germline DNA repair-deficient prostate cancer. *Eur Urol* 72:34-42, 2017
9. Cancer Genome Atlas Research Network: The Molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell* 163:1011-1025, 2015
10. Castro E, Goh C, Olmos D, 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* 31:1748-1757, 2013
11. Castro E, Goh C, Leongamornlert D, et al: Effect of *BRCA* mutations on metastatic relapse and cause-specific survival after radical treatment for localised prostate cancer. *Eur Urol* 68:186-193, 2015
12. National Comprehensive Cancer Network: Prostate cancer, Version 1.2018. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf.
13. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al: DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 373:1697-1708, 2015
14. Cheng HH, Pritchard CC, Boyd T, et al: Biallelic inactivation of *BRCA2* in platinum-sensitive metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 69:992-995, 2016
15. Pomerantz MM, Spisák S, Jia L, et al: The association between germline *BRCA2* variants and sensitivity to platinum-based chemotherapy among men with metastatic prostate cancer. *Cancer* 123:3532-3539, 2017
16. Quigley D, Alumkal JJ, Wyatt AW, et al: Analysis of circulating cell-free DNA identifies multiclonal heterogeneity of *BRCA2* reversion mutations associated with resistance to PARP inhibitors. *Cancer Discov* 7:999-1005, 2017
17. Goodall J, Mateo J, Yuan W, et al: Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition. *Cancer Discov* 7:1006-1017, 2017
18. Hussain M, Daignault-Newton S, Twardowski PW, et al: Targeting androgen receptor and DNA repair in metastatic castration-resistant prostate cancer: Results from NCI 9012. *J Clin Oncol* 36:991-999, 2017
19. Gallagher DJ, Cronin AM, Milowsky MI, et al: Germline *BRCA* mutation does not prevent response to taxane-based therapy for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *BJU Int* 109:713-719, 2012
20. Nientiedt C, Heller M, Endris V, et al: Mutations in *BRCA2* and taxane resistance in prostate cancer. *Sci Rep* 7:4574, 2017
21. Mateo J, Cheng HH, Beltran H, et al: Clinical outcome of prostate cancer patients with germline DNA repair mutations: Retrospective analysis from an international study. *Eur Urol* 73:687-693, 2018
22. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, 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* 74:218-225, 2018
23. Annala M, Vandekerckhove G, Khalaf D, et al: Circulating tumor DNA genomics correlate with resistance to abiraterone and enzalutamide in prostate cancer. *Cancer Discov* 8:444-457, 2018
24. Scher HI, Halabi S, Tannock I, 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* 26:1148-1159, 2008
25. Wang K, Li M, Hakonarson H: ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38:e164, 2010
26. Richards S, Aziz N, Bale S, et al: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405-424, 2015
27. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al: Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536:285-291, 2016
28. Rubinstein LV, Gail MH, Santner TJ: Planning the duration of a comparative clinical trial with loss to follow-up and a period of continued observation. *J Chronic Dis* 34:469-479, 1981
29. Janavičius R: Founder *BRCA1/2* mutations in the Europe: Implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J* 1:397-412, 2010
30. Osorio A, Rodríguez-López R, Díez O, et al: The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the *CHEK2* gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 108:54-56, 2004
31. Win AK, Reece JC, Dowty JG, et al: Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in *MUTYH*. *Int J Cancer* 139:1557-1563, 2016
32. Mandelker D, Zhang L, Kemel Y, et al: Mutation detection in patients with advanced cancer by universal sequencing of cancer-related genes in tumor and normal DNA vs guideline-based germline testing. *JAMA* 318:825-835, 2017
33. González-Rivera M, Lobo M, López-Tarruella S, et al: Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial. *Breast Cancer Res Treat* 156:507-515, 2016
34. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, et al: Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the *ATM* gene. *Breast Cancer Res Treat* 161:597-604, 2017
35. Castro E, Jugurnauth-Little S, Karlsson Q, et al: High burden of copy number alterations and c-MYC amplification in prostate cancer from *BRCA2* germline mutation carriers. *Ann Oncol* 26:2293-2300, 2015
36. Taylor RA, Fraser M, Livingstone J, et al: Germline *BRCA2* mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nat Commun* 8:13671, 2017
37. Isaacsson Velho P, Silberstein JL, Markowski MC, et al: Intraductal/ductal histology and lymphovascular invasion are associated with germline DNA-repair gene mutations in prostate cancer. *Prostate* 78:401-407, 2018

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

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

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/jco/site/ffc.

Elena Castro

Honoraria: Astellas Pharma, Janssen-Cilag, AstraZeneca, Bayer
Consulting or Advisory Role: Bayer, Janssen, Bayer (I), Janssen (I)
Research Funding: AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst), Janssen (Inst)
Travel, Accommodations, Expenses: Bayer, Janssen, Roche, Astellas Pharma

Nuria Romero-Laorden

Honoraria: Bayer, Pfizer, Astellas Pharma, Sanofi, Janssen-Cilag, Roche, PharmaMar
Research Funding: Janssen-Cilag (Inst), Bayer (Inst), Astellas Pharma (Inst), Sanofi (Inst)
Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer, Janssen-Cilag, Roche

Rebeca Lozano

Speakers' Bureau: Roche, Janssen-Cilag
Travel, Accommodations, Expenses: Roche, Janssen-Cilag

Ana Medina

Honoraria: Janssen-Cilag, Bristol-Myers Squibb, Merck
Consulting or Advisory Role: Bristol-Myers Squibb
Travel, Accommodations, Expenses: Sanofi, Janssen-Cilag, Bristol-Myers Squibb, Roche
Other Relationship: Novartis

Javier Puente

Consulting or Advisory Role: Pfizer, Astellas Pharma, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme, Bayer, Roche, Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Clovis Oncology, Ipsen, Eisai, EUSA Pharma, Sanofi
Speakers' Bureau: Pierre Fabre, Celgene, Kiowa, Novartis, Lilly
Research Funding: Astellas Pharma, Pfizer
Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer, Roche, Janssen-Cilag

Josep Maria Piulats

Consulting or Advisory Role: Janssen Oncology, Astellas Pharma, VCN Biosciences, Clovis Oncology, Roche, Genentech, Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme
Research Funding: Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, EMD Serono, Incyte, Janssen Oncology
Travel, Accommodations, Expenses: Janssen Oncology, Roche, Bristol-Myers Squibb

David Lorente

Consulting or Advisory Role: Janssen Oncology, Sanofi, Bayer Health
Speakers' Bureau: Janssen Oncology, Bayer Health, Astellas Pharma, Sanofi
Travel, Accommodations, Expenses: Janssen Oncology, Sanofi, Astellas Pharma, Celgene

Rafael Morales-Barrera

Consulting or Advisory Role: MSD, Sanofi, AstraZeneca
Speakers' Bureau: MSD Oncology, Asofarma
Travel, Accommodations, Expenses: MSD, Sanofi, AstraZeneca, Astellas, J&J, Bayer

Enrique Gonzalez-Billalabeitia

Travel, Accommodations, Expenses: Bristol-Myers Squibb, Pfizer, Janssen-Cilag, Astellas Pharma, Sanofi

Iciar García-Carbonero

Consulting or Advisory Role: Janssen Oncology, Astellas Pharma, Bayer, Sanofi
Travel, Accommodations, Expenses: Astellas Pharma, Janssen, Sanofi, Bayer

Pablo Borrega

Consulting or Advisory Role: Bayer, Janssen-Cilag, Astellas Pharma

M. José Mendez Vidal

Consulting or Advisory Role: Janssen-Cilag, Pfizer, Astellas Pharma, Sanofi, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Novartis, Roche
Travel, Accommodations, Expenses: Janssen-Cilag, Pfizer, Astellas Pharma, Bristol-Myers Squibb

Alvaro Montesa

Consulting or Advisory Role: Pfizer, Janssen-Cilag, Sanofi, Astellas Pharma, Ipsen, Roche, Bristol-Myers Squibb, Takeda
Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer

Aránzazu Gonzalez del Alba

Consulting or Advisory Role: Astellas Pharma, Sanofi, Bayer, Janssen Oncology, Pfizer, Bristol-Myers Squibb, Eisai, Pierre Fabre, EUSA Pharma, Roche, Novartis, Ipsen, Astellas Pharma
Travel, Accommodations, Expenses: Astellas Pharma, Pfizer, Janssen Oncology, Sanofi, Bristol-Myers Squibb, MSD Oncology

Alejo Rodriguez-Vida

Honoraria: Astellas Pharma, AstraZeneca, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Janssen, MSD, Roche, Pfizer, Sanofi
Consulting or Advisory Role: Astellas Pharma, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Janssen, MSD, Roche, Pfizer
Research Funding: Takeda (Inst), MSD (Inst), Pfizer (Inst)
Travel, Accommodations, Expenses: Bristol-Myers Squibb, Bayer, Janssen, Ipsen, Clovis Oncology, Novartis, Astellas Pharma

Begoña Perez-Valderrama

Honoraria: Pierre Fabre, Astellas Pharma, Novartis, Bristol-Myers Squibb, Ipsen
Consulting or Advisory Role: Astellas Pharma, Novartis, Pfizer, Pierre Fabre, Bayer, Sanofi, Bristol-Myers Squibb, Roche, Ipsen
Travel, Accommodations, Expenses: Janssen-Cilag, Bristol-Myers Squibb

Elena Vallespín

Patents, Royalties, Other Intellectual Property: Royalties from KARYOARRAY-8.512.907. FIBHULP. INGEMM
Expert Testimony: Scienceboard.net
Other Relationship: ENAC (Spanish National Accreditation Body)

Enrique Gallardo

Honoraria: Astellas Pharma, Roche, Bristol-Myers Squibb, Novartis
Consulting or Advisory Role: Pfizer, Bayer Schering Pharma, Janssen Oncology, Astellas Pharma, Roche, Bristol-Myers Squibb, Sanofi, Ipsen, Eisai, Rovi, Daiichi Sankyo, EUSA Pharma
Speakers' Bureau: Rovi, LEO Pharma, Menarini, Bristol-Myers Squibb, Ipsen, Astellas Pharma, Roche, Daiichi Sankyo
Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer, Astellas Pharma, Pierre Fabre, Bayer Schering Pharma, Bristol-Myers Squibb, Eisai, Janssen, Roche

Sergio Vazquez

Consulting or Advisory Role: Roche Pharma AG, AstraZeneca Spain, Bayer, Pfizer, Novartis, MSD Oncology, Lilly, Bristol-Myers Squibb, Sanofi, Boehringer Ingelheim
Speakers' Bureau: Roche, AstraZeneca Spain, Novartis, Boehringer Ingelheim, Bayer, Bristol-Myers Squibb
Travel, Accommodations, Expenses: AstraZeneca Spain, Roche Pharma AG

Pablo Lapunzina

Consulting or Advisory Role: Roche, Pfizer
Research Funding: Biomarin
Patents, Royalties, Other Intellectual Property: Intellectual property of a microarray design (KaryoArray)

David Olmos

Honoraria: Bayer, Janssen, Sanofi
Consulting or Advisory Role: Janssen, Bayer, AstraZeneca, Clovis Oncology
Research Funding: AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst), Janssen (Inst), Genentech (Inst), Roche (Inst), Pfizer (Inst), Astellas Medivation (Inst), Tokai Pharmaceuticals (Inst)
Travel, Accommodations, Expenses: Bayer, Janssen, Ipsen

No other potential conflicts of interest were reported.

APPENDIX

The following is a full list of the study sites and principal investigators who have participated in the PROREPAIR-B ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03075735) identifier: NCT03075735) study: Hospital Universitario Quirón, Pozuelo de Alarcón, Almagro, Elena; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Arranz, José Angel; Hospital General Universitario Morales Meseguer, Murcia, Gonzalez-Billalabeitia, Enrique; Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Borrega, Pablo; Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Castro, Elena; Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Contreras, José Antonio; Fundació Althaia, Manresa, Domenech, Monserrat; Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Escribano, Ricardo; Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Fernández-Parra, Eva; Parc Taulí Hospital Universitari, Sabadell, Gallardo, Enrique; Hospital Virgen de la Salud, Toledo, García-Carbonero, Iciar; Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Salamanca, García, Rocío; Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Garde, Javier; Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, González del Alba, Arantzazu; Hospital de Son Llatzer, Palma de Mallorca, González, Belén; Onkologikoa, Instituto Oncológico de Kutxa, Donostia, Hernández, Amaia; Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Hernando, Susana; Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Jiménez, Pedro; Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Láinez, Nuria; Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, Lorente, David; Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, Luque, Raquel; Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Martínez, Esther; Centro Oncológico de Galicia, A Coruña, Medina, Ana; Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Méndez-Vidal, María José; Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Montesa, Alvaro; Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Morales, Rafael; Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Olmos David; Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Pérez-Gracia, José Luis; Hospital Univesitario Virgen del Rocío, Sevilla, Pérez-Valderrama, Begoña; Hospital Universitario La Paz, Madrid, Pinto, Alvaro; and Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, Hospitalet de Llobregat, Piulats, Josep. Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, Puente, Javier; Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Querol, Rosa; Hospital del mar, Barcelona, Rodríguez-Vida, Alejo; Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Romero-Laorden, Nuria; Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Saez, Maria Isabel; Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, Vazquez, Sergio; Hospital San Pedro, Logroño, Vélez, Edelmira; Hospital General Universitario Ciudad Real, Ciudad Real, Villa-Guzmán, José Carlos; Hospital Costa del Sol, Marbella, Villatoro, Rosa; Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Zambrana, Francisco.

Supplementary Methods

PROREPAIR-B Eligibility Criteria

Inclusion Criteria

1. Patients must be 18 years or older and provide informed consent.
2. Histopathology confirmation of prostate cancer diagnosis from diagnostic prostate biopsy, metastasis biopsy, and/or prostatic resection.
3. Germline mutation carrier status unknown at study entry. Patients should have not undergone genetic testing for DNA damage repair (DDR) genes before they entered the study.
4. Confirmed serum testosterone levels that corresponded to adequate castration status (< 50 ng/mL) at progression to metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC).
5. Patients must meet biochemical and/or radiologic criteria for mCRPC progression (according to the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group [PCWG2]), as follows²⁴:
 - a. Biochemical progression by prostate-specific antigen (PSA) must be demonstrated with at least three consecutive

values that increased greater than the nadir, at least two with a total increase greater than the nadir of more than 2 ng/mL, and a relative increase greater than 50%.

- b. Those patients who have received a classical antiandrogen (bicalutamide, flutamide, nilutamide, or cyproterone acetate) must have a confirming PSA that meets the progression criteria at least 4 weeks after antiandrogen withdrawal.
 - c. Those patients who present with new metastases without confirmed PSA progression but with castrate levels of testosterone will be eligible if prostatic origin is demonstrated.
6. Patients must have bone, visceral, and/or nodal metastasis demonstrated by computed tomography (CT) scan, technetium-99m bone scan, and/or magnetic resonance imaging (MRI) scan. When a patient presents with nodal disease only, at least one node must be located above the bifurcation of iliac arteries and it must be 15 mm or longer in the short axis to be considered metastatic disease.
 7. Eligible patients for this study could meet the criteria for progression to mCRPC (specifically, points 4, 5, and 6 in this list) before consent and initiation of screening as long as the following were met: 6 or fewer months elapsed since mCRPC criteria were met for first time and patients were treatment naive for mCRPC, with the exception of secondary and/or tertiary hormonal maneuvers. Bisphosphonates or denosumab also were allowed between the diagnosis of mCRPC and study entry. Taxane treatment in a metastatic hormone-sensitive setting was allowed.
 8. Eligible patients must be candidates to start a first-line treatment with an approved survival-prolonging therapy (SPT) for mCRPC (docetaxel, cabazitaxel, enzalutamide, abiraterone, or radium-223 [²²³Ra]). Treatment should be started within 6 months of study consent.
 9. Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status less than 2 at study entry was required.

Exclusion Criteria

1. Inadequate documentation of the mCRPC progression criteria and dates of mCRPC diagnosis.
2. Impossibility to adhere to the study follow-up guidelines for mCRPC or to provide the required essential clinical and/or analytical data for the study.
3. Prior diagnosis of cancer, except the patients who had the following:
 - a. localized malignant tumor treated with radical/curative intention and who have been free of disease for at least 5 years;
 - b. diagnosed and treated for a localized skin-cancer (not a melanoma); and
 - c. completely resected in situ carcinoma.
4. Any medical condition which, according to investigator judgment, may interfere with the patient ability to provide informed consent, the adequate recovery of health information, or the execution of the required follow-up evaluations.

Expanded Study Procedures

A baseline imaging evaluation within 6 weeks of study entry (CT/ MRI and bone scans) and a complete full blood count and biochemistry, including PSA and testosterone within 2 weeks of study entry, were required. Prognostic data at the time of mCRPC and prior treatment history were also recorded at enrollment. All treatments were by physician choice and were not dictated by the study, but clinical, radiologic, and analytic baseline assessments were mandatory before each treatment line with an SPT was started. A 5-mL blood sample was drawn at study entry for germline DNA extraction.

The start and end dates as well as the doses of each SPT administered were recorded. Patients on active treatment were prospectively observed with regular clinical and PSA evaluations every 3 to 4 weeks and CT/MRI and bone scans every 12 to 16 weeks. Responses and progression were evaluated according to PCWG2.²⁴ Clinical progression was defined by protocol; nonetheless, the final decision to discontinue a treatment and/or to start a new line rested with the treating physician. Patients who permanently discontinued all active treatments were observed for survival at least every 12 weeks until death.

Clinical Progression Criteria

1. ECOG deterioration by two or more points from treatment baseline because of worsening prostate cancer–related symptoms.
2. Worsening prostate cancer–related pain, except for bone pain flare related to treatment initiation (first 12 weeks) or transitory^{22,3} Ra-related pain after treatment dosing, that meet one of the following:
 - a. New pain not controlled with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and that requires initiation of opioids (minor/major) for longer than a week;
 - b. Previously existing pain that increases in grade for longer than a week and requires increased analgesia to major opioids or to duplicate the dose of major opioids;
 - c. Bone pain that requires palliative external irradiation.
3. Pathologic fracture related to prostate cancer and not attributable to osteoporosis.
4. Cord compression because of prostate cancer.
5. Initiation of a new treatment line because of new or worsening prostate cancer–related symptoms.
6. Any sign or symptom in the patient's evolution that, according to the judgment of the treating physician, represents an unequivocal sign of clinical progression after treatment.
7. Death as a result of prostate cancer or attributable to prostate cancer.

Sample collection. A mandatory 5-mL whole-blood sample was collected in EDTA in all patients to obtain germline DNA. Optional blood samples for plasma and whole-blood RNA isolation were collected in 9-mL Streck (STRECK, Omaha, NE) and 2.5-mL PAXgene (PreAnalytik GmbH, Hombrechtikon, Switzerland) tubes, respectively, at multiple time points, which included the following: baseline for each treatment line, after 8 to 12 weeks of treatment, and at progression for each treatment line. Archived tumor samples were also collected.

DNA extraction and sequencing. Germline DNA was extracted from EDTA tubes using the Flexigene DNA kit (QIAGEN, Germantown, MD) and the QiaCube platform (Qiagen Crawley, United Kingdom). Quantification of DNA was performed using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, Frederick, MD). Sequencing libraries were generated from 250 ng of germline DNA using the custom panel with NimbleGen SeqCap XL target enrichment (Roche, Pleasanton, CA) and read using an Illumina NexSeq 500 platform (Illumina, San Diego, CA). On average, 2 to 3 million 100-bp reads, with a mean coverage of greater than $\times 150$ for each sample, were obtained. All variants identified as pathogenic and likely pathogenic were validated using multicapillary electrophoresis ABI 3730x1s (SeqGen, Torrance, GA), polymerase chain reaction, or MLPA, as appropriate. An independent validation of some rare variants that involve exon deletions was conducted at the University of Washington using the BROCA panel.

Sequencing data pre-processing and data quality control

First data analysis consisted in transformation of the bcl files from the NextSeq 500 sequencer to fastq files by using the Illumina des-multiplexing tool, bcl2fastq (Illumina, San Diego, CA). Then, the sequences were mapped to the University of California Santa Cruz human reference genome hg19 (version February 2009) with Bowtie2 (Langmead B, et al: *Nat Methods* 9:357-359, 2012). Duplicate reads were removed using the Picard RemoveDuplicated function (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Indel realignment and base quality

score recalibration were performed afterward (with Realigner TargetCreator and IndelRealigner functions from the suite Genome Analysis Toolkit [GATK]) following the best practices proposed by GATK (McKenna A, et al: *Genome Res* 20:1297-1303, 2010; DePristo MA, et al: *Nat Genet* 43:491-498, 2011; Van der Auwera GA, et al: *Curr Protoc Bioinformatics* 43:1110-1133, 2013). Variant calling was performed over the re-aligned and re-calibrated BAM files. The characterized variants were the result of an in-house consensus between the outputs of the GATK variant callers UnifiedGenotyper and HaplotypeCaller. The condensed vcf files were filtered and annotated with Annovar.²⁵ In addition, the vcf files were enriched with prediction tools of pathogenicity provided by the proxy dbNSFP (release 3.0; Liu X, et al: *Hum Mutat* 37:235-241, 2016) together with population data [Exac Non-Finnish European data²⁷ and CIBERER Spanish Variant Server (<http://csvs.babelomics.org/>)], and clinical and genomic information from matched Clinvar (Landrum MJ, et al: *Nucleic Acids Res* 44:D862-D868, 2016) records.

In parallel to the analysis process, an exhaustive quality control of the sequenced samples was performed. In addition, the samples were crossed out to determine relationships among them. No family relationships were identified, and a sample duplication was detected. The quality of the sequencing procedure was assessed by a range of markers, such as the percentage of mapped reads, the percentage of mapped reads in the region of interest (ROI), the percentage of duplicated reads and the percentage of ROI over a depth of $\times 20$ (ie, horizontal coverage). In addition, the final efficiency of each sample was measured by the ratio of sequences that were eligible for variant determination and the initial number of mapped reads.

Variants classification and review panel. Germline variants with a minor allele frequency of 0.5% or higher in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database (release 0.3) were discarded.²⁷ From the remaining variants, those classified in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; Landrum MJ, et al: *Nucleic Acids Res* 44:D862-D868, 2016) as pathogenic/likely pathogenic were confirmed and classified as such. The remaining variants were filtered according to ANNOVAR and ClinVar annotations. Those not previously reported, or reported as variants of unknown significance, were review independently by three investigators with training in cancer genetics (E.C., N.R.L., R.L.) blinded to patient outcomes and according to the guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics.²⁶ Then each potentially pathogenic variant according to ClinVar or American College of Medical Genetics and Genomics criteria was discussed and classified by the following study panel: Elena Castro, Medical Oncologist, Cancer Genetics; Nuria Romero-Laorden, Medical Oncologist, Cancer Genetics; Rebeca Lozano, Medical Oncologist, Cancer Genetics; Angela del Pozo, Bioinformaticist; Pablo Lapunzina, Medical Geneticist; Colin C. Pritchard, Molecular Pathologist, Cancer Genetics; and David Olmos, Medical Oncologist, Genomics.

Definition of positive family history of cancer. Prior family history of cancer was collected on at least three generations for each person in the study. A positive family history of cancer was defined as the occurrence of prostate, breast, ovarian, or other tumor types (excluding nonmelanoma skin tumors) in first- or second-degree relatives.

Frequency of pathogenic variants in ExAC and CSVS populations

ExAC noncancer data ($n = 53,105$) and CIBERER Spanish Variant Server (CSVs; <http://csvs.babelomics.org/>; $n = 1,551$) populations were filtered and reviewed using the same criteria by four reviewers.

Time-to-event end points definition. Cause-specific survival (CSS) was prospectively defined and measured. CSS from mCRPC was calculated from the confirmation date of mCRPC (biochemical and/or radiologic progression to mCRPC) or treatment starting date to the date of death. Progression to castration resistance and diagnosis of metastasis for first time may not happen at the same time, so the date of mCRPC diagnosis was the date in which both events were present:

progression to castration resistance (biochemical and/or radiologic) and evidence of metastasis in CT/MRI or bone scan.

CSS from any specific treatment line was calculated from treatment starting date (first dose) to the date of death. A death was considered related to prostate cancer if the main cause of death was prostate cancer, complications secondary to the prostate cancer spread, or any complication directly related to the treatment of prostate cancer. When the cause of death was unrelated to prostate cancer, the patient data were censored at the time of death for any CSS analysis.

Those patients who remained alive at the time of database cutoff for this analysis were censored at the last follow-up. Similarly, patients lost to follow-up but who were alive at the last evaluation were censored at the time of the last evaluation.

Time to PSA progression (TTPP) was prospectively defined and measured. TTPP was defined as the time elapsed from initiation of treatment to PSA progression. According to PCWG2 criteria, PSA progression was considered the date that an increase of 25% or more and absolute increase of 2 ng/mL or more from the nadir were documented. For patients who had an initial PSA decline during treatment, this had to be confirmed by a second value more than 3 weeks later.

TTPA was censored at the time of the last regular PSA evaluation in those patients without biochemical progression at the end of the monitoring, at the start of a new line of treatment, and/or at death. Patients with a PSA less than 2 ng/mL at the starting date of any treatment line were not eligible for TTPP.

Progression-free survival (PFS) was prospectively defined and measured. PFS was defined as the time from initiation of treatment to disease progression in bone or soft tissue according to radiographic criteria (PCWG2 and RECIST 1.1) or by symptoms according to clinical criteria (defined by protocol, including death), whichever occurred first.

Additional statistical methods. All continuous variables were transformed into binomial variables according to standard reference or median values. Patient characteristics were compared between noncarriers and carriers for the pre-planned subgroups (*ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2*; *BRCA2*; and all gDDR carriers). The association of mutation status with baseline characteristics and family cancer history as well as the comparison of the prevalence of mutations between our patients and the general population were tested using the χ^2 , Fisher's exact, or Mann-Whitney *U* test, as appropriate.



FIG A1. Mutation lollipop that shows the distribution of the presumed pathogenic mutations identified. BHD, β -hairpin domain; DEAD-2, a conserved and ubiquitous domain within a number of RAD3-like DNA-binding helicases; DRMBL, DNA repair metallo-beta-lactamase domain; FAT, FRAP-ATM- TRRAP domain; FATC, FAT-C-terminal domain; FHA, forhead-associated domain; HMG, high mobility group; MutS, MutS domain; NUDIX, NUDIX domain; res, restriction enzyme, res subunit; TAN, *Tel1/ATM N*-terminal motif; WD40, WD domain, G-beta repeat; WGR, WGR domain.

Role of Inherited DNA Repair Defects in Advanced Prostate Cancer

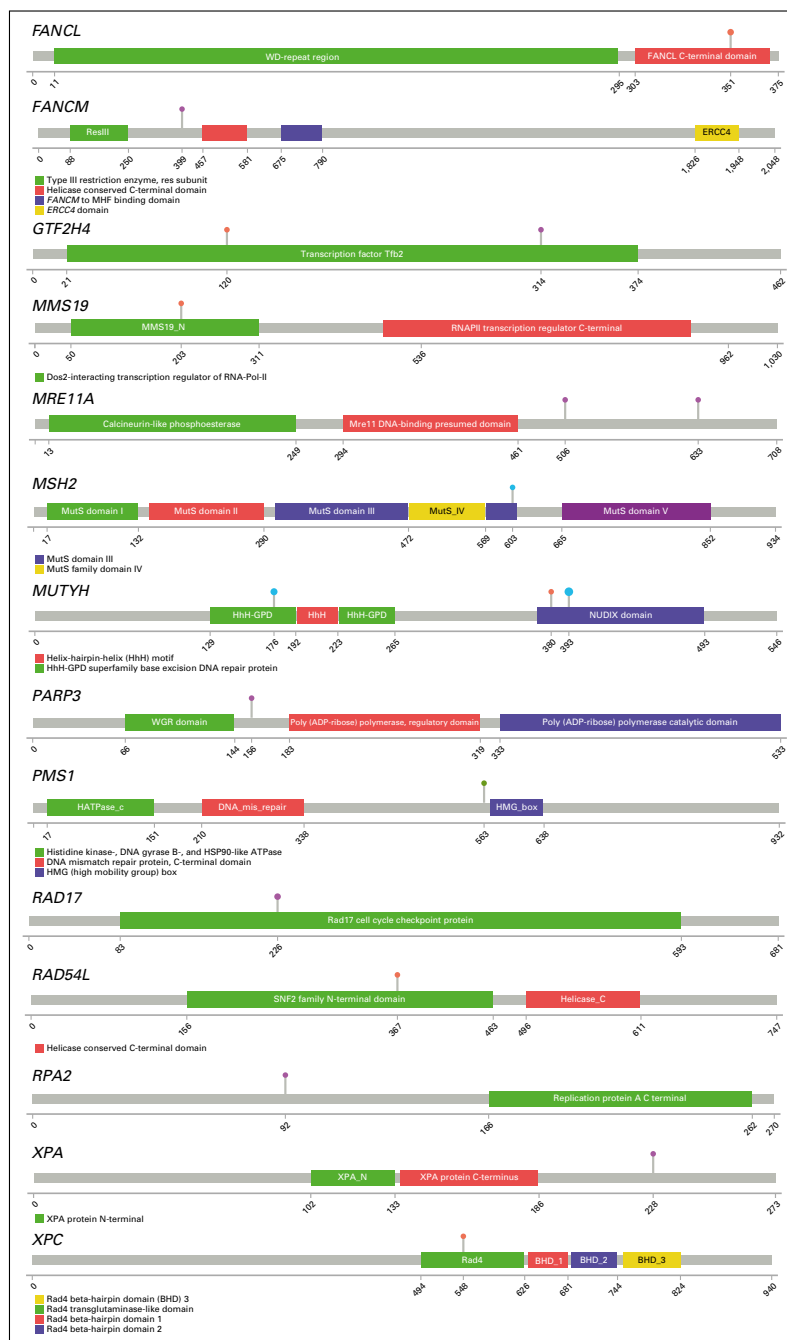


FIG A1. (Continued).

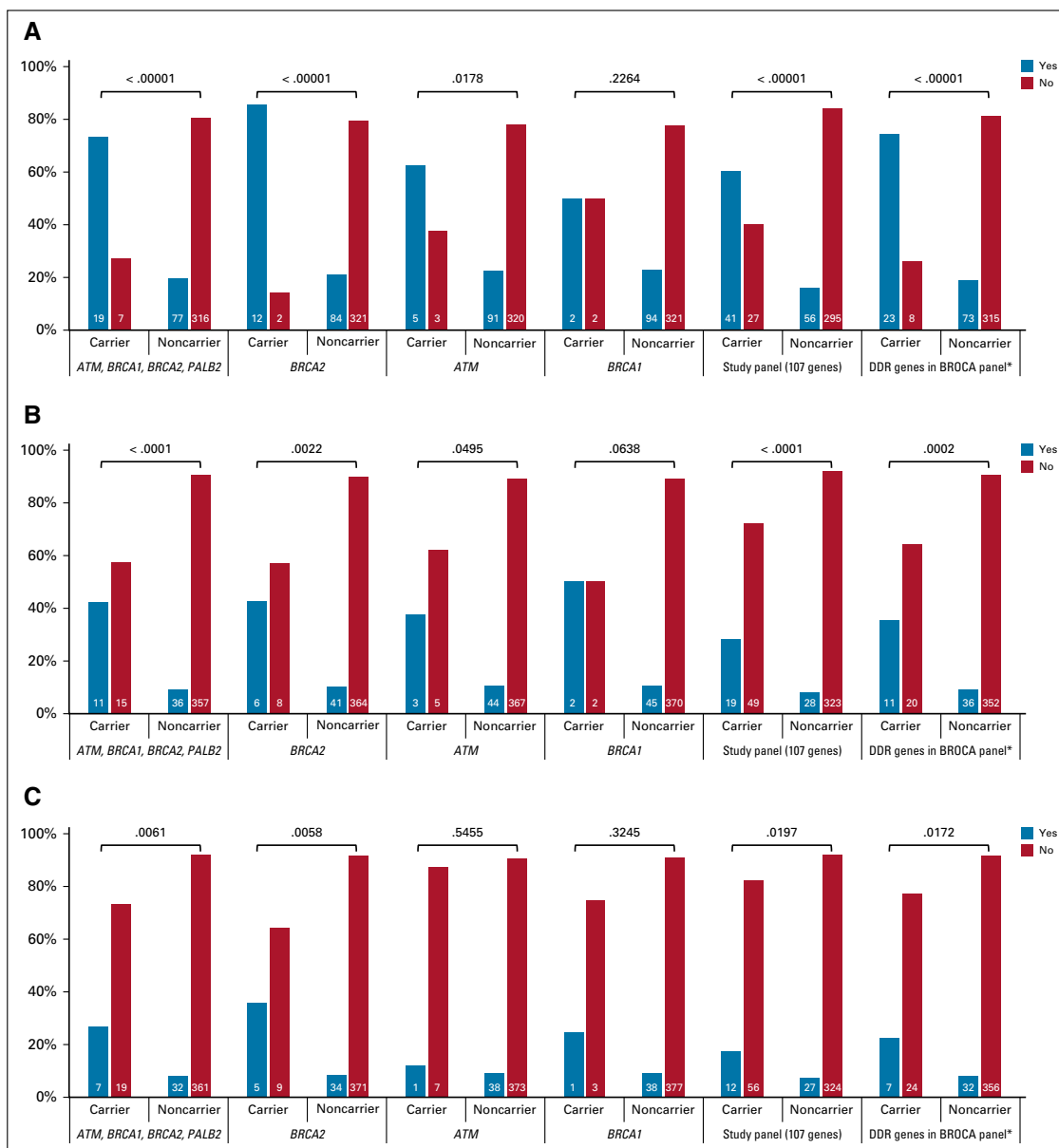


FIG A2. Family history of cancer in first- and second-degree relatives in the carriers and noncarriers groups: (A) all tumors; (B) patients with family history of breast and ovarian cancer; and (C) patients with family history of prostate cancer. (*) ATM, ATR, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, FAM175A, GEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, XRCC2. BROCA, University of Washington Laboratory of Medicine panel; DDR, DNA damage repair.

Role of Inherited DNA Repair Defects in Advanced Prostate Cancer

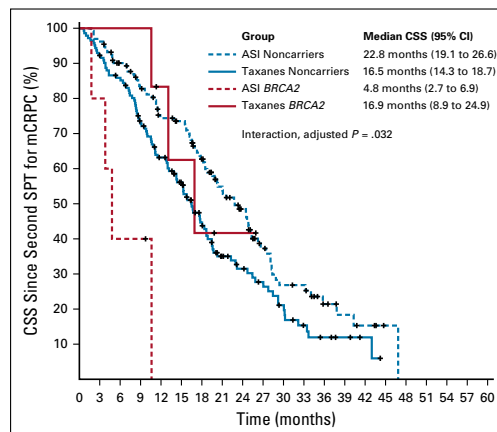


FIG A3. Kaplan-Meier analysis for cause-specific survival (CSS) and interaction between *BRCA2* carrier status and treatment type administered as second-line survival-prolonging therapy (SPT). ASI, androgen signaling inhibitor; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer.

TABLE A1. List of Pathogenic/Likely Pathogenic Mutations Identified in the Study

ID	Gene	Nucleotide Change	Amino Acid Change
B01006	<i>BRCA2</i>	c.9026_9030del	p.Y3009fs
B01008	<i>CHEK2</i>	c.349A>G	p.R117G
B01009	<i>BRCA2</i>	c.5116_5119del	p.R1704fs
B01012	<i>PMS1</i>	c.1690dup	p.Y563fs
B01019	<i>ATM</i>	c.1262C>A	p.S421*
B01035	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B02002	<i>FANCG</i>	c.907_908dup	p.L303fs
B04001	<i>MUTYH</i>	c.527A>G	p.Y176C
B06006	<i>RAD17</i>	c.676G>T	p.E226*
B06008	<i>RPA2</i>	c.276C>A	p.Y92*
B07003	<i>ATM</i>	c.1336C>T	p.Q446*
B07011	<i>MRE11A</i>	c.1897C>T	p.R633*
B07013	<i>BRCA1</i>	c.2017_2023del	p.673fs
B07020	<i>ATM</i>	c.1442T>G	p.L481*
B07021	<i>ERCC2</i>	c.1847G>C	p.R616P
B08001	<i>BRCA2</i>	c.4889C>G	p.Ser1630*
B09003	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B09004	<i>FANCE</i>	c.1413_1414dup	p.V471fs
B13013	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B13019	<i>DCLRE1C</i>	c.241C>T	p.R81*
B13019	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B13020	<i>XPC</i>	c.1643_1644del	p.V548fs
B13021	<i>FANCF</i>	c.1087C>T	p.Q363*
B13024	<i>BRCA2</i>	c.5720_5723del	p.S1907fs
B13029	<i>BRCA2</i>	c.6650_6654del	p.K2217fs
B13033	<i>BRCA1</i>	c.3756_3759del	p.L1252fs
B13040	<i>ATM</i>	c.1262C>A	p.S421*
B14001	<i>ATM</i>	c.1262C>A	p.S421*
B14014	<i>BRCA2</i>	c.6911T>G	p.L2304*
B14018	<i>XPA</i>	c.682C>T	p.R228*
B14020	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B16001	<i>FANCL</i>	c.1051_1052del	p.S351fs
B16001	<i>RAD17</i>	c.676G>T	p.E226*
B16005	<i>ATM</i>	c.6289G>T	p.E2097*
B20005	<i>PARP3</i>	c.466C>T	p.Q156*
B20018	<i>ATM</i>	c.3381_3384del	p.A1127fs
B21001	<i>MUTYH</i>	c.527A>G	p.Y176C
B21009	<i>ERCC3</i>	c.335dupA	p.H112fs
B21009	<i>FANCD2</i>	c.3496delG	p.R1165fs
B21023	<i>FANCE</i>	c.929dupC	p.A308fs
B21034	<i>MSH2</i>	c.1808A>G	p.D603G
B21045	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B21052	<i>BRCA1</i>	c.211A>G	p.R71G

(continued on following page)

Role of Inherited DNA Repair Defects in Advanced Prostate Cancer

TABLE A1. List of Pathogenic/Likely Pathogenic Mutations Identified in the Study (continued)

ID	Gene	Nucleotide Change	Amino Acid Change
B21059	<i>MUTYH</i>	c.527A>G	p.Y176C
B21060	<i>ERCC6</i>	c.3474_3477del	p.E1158fs
B21066	<i>BRCA2</i>	c.1326_1329del	p.S442fs
B21080	<i>BRCA2</i>	c.9018C>A	p.Y3006*
B21086	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B21091	<i>FANCD2</i>	c.3457G>T	p.E1153*
B26005	<i>EME2</i>	c.886C>T	p.Q296*
B26005	<i>FANCL</i>	c.1051_1052del	p.S351fs
B29001	<i>MUTYH</i>	c.1138delC	p.L380fs
B33002	<i>MRE11A</i>	c.1516G>T	p.E506*
B36001	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B36002	<i>GTF2H4</i>	c.358_374del	p.I120fs
B41005	<i>MMS19</i>	c.607delA	p.R203fs
B41010	<i>BRCA2</i>	c.3648dupT	p.G1215fs
B41027	<i>MUTYH</i>	c.1178G>A	p.G393D
B41031	<i>EME2</i>	c.949_953del	p.F315fs
B41035	<i>BRCA2</i>	c.2701delC	p.L901fs
B42003	<i>BRCA2</i>	c.4963delT	p.C1654fs
B46005	<i>CHEK2</i>	c.591delA	p.K197fs
B46013	<i>BRCA2</i>	c.9018C>A	p.Y3006*
B46017	<i>FANCM</i>	c.1196C>G	p.S399*
B46019	<i>GTF2H4</i>	c.940C>T	p.R314*
B46021	<i>BRCA2</i>	c.3055_3056del	p.L1019fs
B46023	<i>FANCD2</i>	c.3457G>T	p.E1153*
B47006	<i>RAD54L</i>	c.1099delG	p.A367fs
B47007	<i>BRCA1</i>	c.470_471del	p.S157fs
B48002	<i>CDK7</i>	c.874_875dup	p.K291fs
B48011	<i>BRCA2</i>	c.3264dupT	p.P1088fs
B58005	<i>ATM</i>	c.1262C>A	p.S421*

Abbreviation: fs, frameshift.

TABLE A2. Prevalence of Pathogenic Variants in PROREPAIR-B, ExAC, and CSVS

Gene/Group	PROREPAIR-B (n = 419)		ExAC (n = 53,105)		PROREPAIR-B v ExAC		CSVS (n = 1,551)		PROREPAIR-B v CSVS	
	No.	%	No.	%	OR (95% CI)	P	No.	%	OR (95% CI)	P
ABRAXAS2	0	0	13	0.02	—	NS	0	0	—	NS
APEX1	0	0	17	0.03	—	NS	0	0	—	NS
APEX2	0	0	0	0	—	NS	0	0	—	NS
APLF	0	0	0	0	—	NS	0	0	—	NS
ATM	8	1.91	139	0.26	7.4 (3.6 to 15.2)	< .001	3	0.19	10.0 (2.7 to 38.0)	< .001
ATR	0	0	40	0.08	—	NS	1	0.06	—	NS
BARD1	0	0	32	0.06	—	NS	0	0	—	NS
BRCA1	4	0.95	97	0.18	5.3 (1.9 to 14.4)	< .001	2	0.13	7.5 (1.4 to 40.9)	.0210
BRCA2	14	3.34	159	0.30	11.5 (6.6 to 20.1)	< .001	4	0.26	13.4 (4.4 to 40.8)	< .001
BRIP1	0	0	68	0.13	—	NS	1	0.06	—	NS
CDK12	0	0	2	0.00	—	NS	1	0.06	—	NS
CDK7	1	0.24	11	0.02	11.5 (1.5 to 89.6)	< .001	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
CHEK1	0	0	80	0.15	—	NS	1	0.06	—	NS
CHEK2	2	0.48	273	0.51	0.9 (0.2 to 3.7)	NS	1	0.06	7.4 (0.7 to 82.2)	NS
DCLRE1	1	0.24	60	0.11	2.1 (0.3 to 15.3)	NS	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
DDB1	0	0	2	0.00	—	NS	0	0	—	NS
DMC1	0	0	9	0.02	—	NS	0	0	—	NS
EME1	0	0	21	0.04	—	NS	0	0	—	NS
EME2	2	0.48	89	0.17	2.9 (0.7 to 11.6)	NS	1	0.06	7.4 (0.7 to 82.2)	NS
EPCAM	0	0	4	0.01	—	NS	0	0	—	NS
ERCC1	0	0	6	0.01	—	NS	0	0	—	NS
ERCC2	1	0.24	230	0.43	0.5 (0.1 to 3.9)	NS	0	0	—	NS
ERCC3	1	0.24	102	0.19	1.2 (0.2 to 8.9)	NS	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
ERCC4	0	0	43	0.08	—	NS	1	0.06	—	NS
ERCC5	0	0	75	0.13	—	NS	0	0	—	NS
ERCC6	1	0.24	62	0.12	2.0 (0.3 to 14.8)	NS	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
ERCC8	0	0	19	0.04	—	NS	0	0	—	NS
FAAP20	0	0	12	0.025	—	NS	0	0	—	NS
FAAP24	0	0	10	0.02	—	NS	0	0	—	NS
FAM175B	0	0	10	0.02	—	NS	0	0	—	NS
FANCA	0	0	88	0.17	—	NS	0	0	—	NS
FANCB	0	0	0	0	—	NS	0	0	—	NS
FANCC	0	0	36	0.07	—	NS	0	0	—	NS
FANCD2	3	0.72	77	0.14	5.0 (1.6 to 15.8)	.0251	1	0.06	11.3 (1.0 to 107.7)	NS
FANCE	2	0.48	34	0.06	7.5 (1.8 to 31 to 3)	.0323	0	0	—	.0452
FANCF	1	0.24	178	0.34	0.7 (0.1 to 5.1)	NS	0	0	—	NS
FANCG	1	0.24	25	0.05	5.1 (0.7 to 37.6)	NS	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
FANCI	0	0	61	0.11	—	NS	0	0	—	NS
FANCL	2	0.48	15	0.03	17.0 (3.9 to 74.5)	.0077	0	0	—	.0452
FANCM	1	0.24	178	0.34	0.7 (0.1 to 5.7)	NS	1	0.06	—	NS
GEN1	0	0	41	0.08	—	NS	1	0.06	—	NS
GFT2H3	0	0	7	0.01	—	NS	0	0	—	NS

(continued on following page)

TABLE A2. Prevalence of Pathogenic Variants in PROREPAIR-B, ExAC, and CSVS (continued)

Gene/Group	PROREPAIR-B (n = 419)		ExAC (n = 53,105)		PROREPAIR-B v ExAC		CSVS (n = 1,551)		PROREPAIR-B v CSVS	
	No.	%	No.	%	OR (95% CI)	P	No.	%	OR (95% CI)	P
GFT2H5	0	0	3	0.01	—	NS	0	0	—	NS
GTF2H1	0	0	1	0.00	—	NS	0	0	—	NS
GTF2H2	0	0	4	0.01	—	NS	0	0	—	NS
GTF2H4	2	0.48	4	0.01	63.7 (11.6 to 348)	< .001	0	0	—	.0452
KIAA0415	0	0	49	0.09	—	NS	3	0.19	—	NS
LIG4	0	0	36	0.07	—	NS	0	0	—	NS
MBD4	0	0	92	0.17	—	NS	0	0	—	NS
MLH1	0	0	10	0.02	—	NS	0	0	—	NS
MLH3	0	0	78	0.15	—	NS	1	0.06	—	NS
MMS19	1	0.24	12	0.02	10.6 (1.4 to 81.6)	< .001	0	0	—	NS
MNAT1	0	0	20	0.04	—	NS	0	0	—	NS
MPG	0	0	10	0.02	—	NS	0	0	—	NS
MRE11A	2	0.48	32	0.06	8.0 (1.9 to 33.3)	.0291	0	0	—	.0452
MSH2	1	0.24	21	0.04	6.0 (1.0 to 45.0)	NS	4	0.26	0.9 (0.1 to 8.3)	NS
MSH3	0	0	90	0.17	—	NS	2	0.13	—	NS
MSH4	0	0	45	0.08	—	NS	0	0	—	NS
MSH5	0	0	60	0.11	—	NS	2	0.13	—	NS
MSH6	0	0	36	0.07	—	NS	1	0.06	—	NS
MUS81	0	0	8	0.02	—	NS	0	0	—	NS
MUTYH	13	3.10	729	1.37	2.3 (1.3 to 4.0)	.0091	14	0.90	3.5 (1.6 to 7.5)	.0016
NBN	0	0	52	0.10	—	NS	0	0	—	NS
NEIL1	0	0	284	0.53	—	NS	0	0	—	NS
NEIL2	0	0	41	0.08	—	NS	0	0	—	NS
NEIL3	0	0	36	0.07	—	NS	0	0	—	NS
NHEJ1	0	0	5	0.01	—	NS	0	0	—	NS
NTHL1	0	0	200	0.38	—	NS	0	0	—	NS
OGG1	0	0	226	0.43	—	NS	0	0	—	NS
PALB2	0	0	65	0.12	—	NS	2	0.13	—	NS
PARP1	0	0	16	0.03	—	NS	0	0	—	NS
PARP2	0	0	77	0.14	—	NS	0	0	—	NS
PARP3	1	0.24	195	0.37	0.6 (0.1 to 4.6)	NS	5	0.32	0.7 (0.1 to 6.3)	NS
PMS1	1	0.24	71	0.13	1.8 (0.2 to 12.9)	NS	3	0.19	1.2 (0.1 to 11.9)	NS
PMS2	0	0	60	0.11	—	NS	2	0.13	—	NS
PNPK	0	0	29	0.05	—	NS	1	0.06	—	NS
PRKDC	0	0	1	0.00	—	NS	0	0	—	NS
RAD17	2	0.48	17	0.03	15.0 (3.4 to 65.0)	.0096	3	0.19	2.5 (0.4 to 14.9)	NS
RAD23A	0	0	4	0.01	—	NS	0	0	—	NS
RAD23B	0	0	2	0.00	—	NS	0	0	—	NS
RAD50	0	0	283	0.53	—	NS	8	0.52	—	NS
RAD51	0	0	53	0.10	—	NS	0	0	—	NS
RAD51B	0	0	17	0.03	—	NS	0	0	—	NS

(continued on following page)

TABLE A2. Prevalence of Pathogenic Variants in PROREPAIR-B, ExAC, and CSVS (continued)

Gene/Group	PROREPAIR-B (n = 419)		ExAC (n = 53,105)		PROREPAIR-B v ExAC		CSVS (n = 1,551)		PROREPAIR-B v CSVS	
	No.	%	No.	%	OR (95% CI)	P	No.	%	OR (95% CI)	P
<i>RAD51C</i>	0	0	55	0.10	—	NS	0	0	—	NS
<i>RAD51D</i>	0	0	34	0.06	—	NS	0	0	—	NS
<i>RAD52</i>	0	0	23	0.04	—	NS	1	0.06	—	NS
<i>RAD54B</i>	0	0	156	0.29	—	NS	1	0.06	—	NS
<i>RAD54L</i>	1	0.24	48	0.09	2.6 (0.4 to 19.2)	NS	0	0	—	NS
<i>RAD9A</i>	0	0	13	0.025	—	NS	0	0	—	NS
<i>RBBP8</i>	0	0	93	0.18	—	NS	1	0.06	—	NS
<i>RPA1</i>	0	0	10	0.02	—	NS	0	0	—	NS
<i>RPA2</i>	1	0.24	10	0.02	12.7 (1.6 to 99.5)	NS	1	0.06	3.7 (0.2 to 59.4)	NS
<i>RPA3</i>	0	0	3	0.01	—	NS	0	0	—	NS
<i>SLX1A</i>	0	0	7	0.01	—	NS	0	0	—	NS
<i>SLX1B</i>	0	0	0	0	—	NS	0	0	—	NS
<i>SLX4</i>	0	0	39	0.07	—	NS	0	0	—	NS
<i>SMUG1</i>	0	0	14	0.03	—	NS	0	0	—	NS
<i>TDG</i>	0	0	28	0.05	—	NS	0	0	—	NS
<i>UNG</i>	0	0	16	0.03	—	NS	0	0	—	NS
<i>XAB2</i>	0	0	9	0.02	—	NS	0	0	—	NS
<i>XPA</i>	1	0.24	40	0.08	3.2 (0.4 to 23.1)	NS	0	5	—	NS
<i>XPC</i>	1	0.24	338	0.64	0.4 (0.1 to 2.7)	NS	8	0.52	0.5 (0.1 to 3.7)	NS
<i>XRCC1</i>	0	0	41	0.08	—	NS	1	0.06	—	NS
<i>XRCC2</i>	0	0	15	0.03	—	NS	0	0	—	NS
<i>XRCC3</i>	0	0	12	0.02	—	NS	0	0	—	NS
<i>XRCC4</i>	0	0	49	0.09	—	NS	1	0.06	—	NS
<i>XRCC5</i>	0	0	5	0.01	—	NS	0	0	—	NS
<i>XRCC6</i>	0	0	1	0.00	—	NS	0	0	—	NS

NOTE. P values were obtained with Fisher's exact test for 2-by-2 tables.

Abbreviations: CSVS, CIBERER Spanish Variant Server; ExAC, Exome Aggregation Consortium; NS, not statistically significant; OR, odds ratio.

TABLE A3. Post Hoc Analyses According to Treatment Sequence: Included Patient Baseline Characteristics

Baseline Characteristic	All Eligible Patients			BRCA2 Carriers		
	ASI-TAX (n = 190)	TAX-ASI (n = 150)	P	ASI-TAX (n = 7)	TAX-ASI (n = 7)	P
Median (range) time from continuous ADT to mCRPC, months	29.4 (3.9-149)	25.8 (5.8-205.6)	.4602	13.2 (8.7-76.3)	18.0 (5.9-52.0)	.5350
Gleason score at diagnosis			.4417			.5594
6-7	83 (44.6)	64 (40.5)		3 (42.9)	1 (14.3)	
≥ 8	103 (55.4)	94 (59.5)		4 (57.1)	6 (85.7)	
Metastasis at diagnosis	80 (42.1)	86 (54.4)	.0219	1 (14.3)	5 (71.4)	.1026
Median (range) age at first SPT, years	73.3 (47.2-93.8)	70.1 (50.2-85.0)	< .001	73.2 (62.1-77.7)	61.8 (52.2-77.4)	.1649
Median (range) PSA at first SPT, ng/dL	41.7 (2.3-2138)	72.0 (0.0-2581)	< .001	39.0 (4.9-595)	157 (4.8-1358)	.7104
ECOG performance status			.0023			.1447
0	99 (52.1)	51 (32.5)		3 (42.9)	3 (42.9)	
1	76 (40.0)	92 (58.6)		3 (42.9)	2 (28.6)	
2	15 (7.9)	14 (8.9)		1 (14.3)	2 (28.6)	
Metastases site						
Nodal metastases	101 (53.2)	85 (53.8)	.9052	2 (28.6)	6 (85.7)	.1026
Bone metastases	160 (84.2)	136 (86.1)	.6270	7 (100)	6 (86.8)	1.000
Visceral metastases	14 (7.4)	26 (16.5)	.0814	0	2 (28.6)	.4615
Elevated ALP (> ULN)	76 (40.0)	85 (53.8)	.0102	4 (57.1)	4 (57.1)	1.000
Elevated LDH (> ULN)	60 (31.6)	81 (51.6)	.0002	3 (42.9)	7 (100)	.0699
Hemoglobin < 10 g/dL	6 (3.2)	12 (7.3)	.0628	1 (14.3)	1 (14.3)	1.000
Serum albumin < 3.5 g/dL	10 (5.3)	14 (9.0)	.1808	0	1 (14.3)	1.000

NOTE. Data presented as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: ADT, androgen deprivation therapy; ALP, alkaline phosphatase; ASI, androgen signaling inhibitor; ASI-TAX, group of patients started on an ASI as first SPT and who died during first SPT, experienced progression and started a taxane, or had not discontinued first ASI yet and were eligible to receive a TAX as second SPT; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer; PSA, prostate-specific antigen; SPT, survival-prolonging therapy; TAX, taxane; TAX-ASI, group of patients started on a TAX as first SPT and who died during first SPT, experienced progression and started a taxane, or had not discontinued first TAX yet and were eligible to receive a TAX as second SPT; ULN, upper limit of normal.

TABLE A4. Post Hoc Analyses According to Treatment Sequence: MVA Models for Each Treatment Sequence

Variable in the MVA model for CSS from first SPT*	Taxane-ASI Sequence		ASI-Taxane Sequence	
	MVA HR (95% CI)	P	MVA HR (95% CI)	P
Germline <i>BRCA2</i> mutation status		.0165		.8720
Carrier v noncarrier	2.95 (1.22 to 7.15)		0.81 (0.24 to 2.68)	
Metastasis at diagnosis		.9017		.6254
Yes v no	0.97 (0.64 to 1.47)		1.11 (0.73 to 1.68)	
Median time to mCRPC since ADT, months		.5994		.0003
< 28 v ≥ 28	1.13 (0.72 to 1.75)		2.14 (1.42 to 3.21)	
Median age at first-SPT, years		.8860		.0110
> 72 v ≤ 72	1.03 (0.68 to 1.56)		1.73 (1.13 to 2.63)	
ECOG performance status		.0134		.3752
1 v 0	1.31 (0.80 to 2.14)	.2791	1.17 (0.77 to 1.79)	.4583
2 v 0	3.01 (1.43 to 6.33)	< .001	1.61 (0.81 to 3.21)	.1721
Median PSA at first SPT		.5277		.5277
> 50 v ≤ 50 ng/dL	1.09 (0.83 to 1.43)			
Visceral metastasis		.8968		.7822
Yes v no	0.90 (0.55 to 1.70)		1.13 (0.49 to 2.61)	
Serum ALP		.4676		.1211
Elevated (> ULN) v normal (≤ ULN)	1.19 (0.74 to 1.92)		1.40 (0.92 to 2.14)	
Serum LDH		< .001		.0238
Elevated (> ULN) v normal (≤ ULN)	3.38 (2.09 to 5.46)		1.63 (1.07 to 2.50)	
Hemoglobin level, g/dL		.6914		.1547
< 10 v ≥ 10	1.15 (0.57 to 2.33)		2.12 (0.75 to 5.97)	
Serum albumin, g/dL		.0021		.1095
< 3.5 v ≥ 3.5	2.63 (1.42 to 4.88)		2.05 (0.85 to 4.91)	

Abbreviations: ADT, androgen deprivation therapy; ALP, alkaline phosphatase; ASI, androgen signaling inhibitor; CSS, cause-specific survival; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; mCRPC, metastatic castration-resistant prostate cancer; MVA, multivariable analysis; PSA, prostate-specific antigen; SPT, survival-prolonging therapy; ULN, upper limit of normal.

*The MVA model included all significant variables in the univariable analyses for each treatment sequence strata, all variables that were significantly different between both strata and may have been confounding variables but were not significant in the univariable analyses, and *BRCA2* carrier status.

1.1 Resumen en castellano

“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”

Introducción, objetivos y metodología: Un elevado porcentaje de pacientes con cáncer de próstata metastásico presentan alteraciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN. Sin embargo, las implicaciones clínicas de estas alteraciones y su prevalencia en población mediterránea no están totalmente dilucidadas.

PROREPAIR-B (NCT 03075735) es un estudio de cohorte, multicéntrico y prospectivo en el cual han participado 38 centros hospitalarios en España. Su objetivo principal fue analizar el impacto de las alteraciones a nivel germinal en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* y *PALB2* en la supervivencia causa-específica desde el diagnóstico de resistencia a castración metastásico, y analizar la prevalencia de alteraciones germinales en genes relacionados con la reparación del ADN en esta población.

Los objetivos secundarios incluyeron el análisis del impacto de las mutaciones germinales en genes DDR en tres grupos diferentes: (i) portadores de alteraciones en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2*, (ii) portadores de alteraciones en *BRCA2* y (iii) todos los portadores de alteraciones en alguno de los genes relacionados con la reparación del ADN, en diferentes endpoints: supervivencia causa-específica, tiempo a la progresión por PSA (TPPSA), supervivencia libre de progresión (SLP), respuestas por PSA y respuestas radiológicas de acuerdo a la línea de tratamiento y el tipo de tratamiento (inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos o taxanos).

Pacientes con cáncer de próstata con confirmación histológica y estado de mutación germinal en genes DDR desconocido se incluyeron en el momento del diagnóstico de resistencia a la castración metastásica, tras lo cual se realizó un seguimiento prospectivo hasta su fallecimiento (o pérdida de seguimiento). Los pacientes debían ser candidatos a comenzar un tratamiento de primera línea para CPRcM con alguna de las terapias que en ese momento habían demostrado aumento de supervivencia global (docetaxel, cabazitaxel, abiraterona, enzalutamida o radio-223) dentro de los primeros 6 meses tras el diagnóstico de resistencia a la castración.

Fue necesario realizar una prueba de imagen basal (TC/RM y GGO) dentro de las primeras 6 semanas y una analítica con hemograma y bioquímica completa, incluyendo PSA y testosterona dentro de las 2 primeras semanas de la entrada en el estudio. Se extrajo una muestra de sangre (5 mL) para el análisis de ADN germinal. Se analizó un panel de 107 genes, todos ellos relacionados con la reparación del ADN. La indicación de los tratamientos sistémicos administrados fue a elección del investigador (no dictaminados por el estudio). Las respuestas y progresiones se evaluaron mediante los criterios del PCWG2 (*Prostate Cancer Working Group 2*).

Resultados: Dentro de los 419 pacientes elegibles del estudio, se identificaron 68 portadores de alteraciones (prevalencia del 16,2%) en el panel de 107 genes relacionados con la reparación del ADN, incluyendo 14 portadores de mutaciones en *BRCA2* (3,3%), 8 en *ATM* (1,9%), 4 en *BRCA1* (0,9%) y ninguno en *PALB2*. El estudio no alcanzó su objetivo principal puesto que, aunque la diferencia en la supervivencia causa-específica entre los portadores de alteraciones en *ATM/BRCA1/BRCA2/PALB2* y los no portadores fue de 10 meses, esta diferencia no alcanzó la significación estadística (23,3 vs 33,2 meses, HR 1,32; IC95% 0,81-2,17; p=0,264). Sin embargo, la supervivencia causa-específica en los portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* (*gBRCA2*) fue aproximadamente la mitad con respecto a los no portadores, siendo estadísticamente significativa (17,4 vs 33,2 meses, HR 2,10; IC95% 1,07-4,10; p=0,027). La diferencia en la supervivencia causa-específica fue también estadísticamente significativa cuando se compararon los pacientes *gBRCA2* con portadores de otras alteraciones no-*BRCA2* (17,4 vs 33,8 meses, p=0,048). El análisis multivariable demostró que la presencia de mutación germinal en *BRCA2* es un factor pronóstico independiente para la supervivencia causa-específica (HR 2,11; IC 95% 1,06-4,18, p=0,033). Se observó, además, una interacción significativa entre el estado de *BRCA2* y el tipo de tratamiento recibido (inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos vs taxanos), de tal manera que la supervivencia causa-específica y la supervivencia libre de progresión 2 fueron superiores en aquellos pacientes *gBRCA2* tratados en primera línea con abiraterona o enzalutamida en comparación con los pacientes tratados en primera línea con taxanos (supervivencia causa específica en *gBRCA2*: 24,0 vs 10,7 meses con ARSi vs taxanos, respectivamente; SLP2 en *gBRCA2*: 18,9 vs 8,6 meses con ARSi vs taxanos, respectivamente). Esta diferencia no se observó en pacientes no portadores.

Conclusiones: PROREPAIR-B es el primer estudio diseñado para analizar la prevalencia de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN en población mediterránea, y el primero en analizar de forma prospectiva el impacto de estas alteraciones en la supervivencia de pacientes con CPRCm, en una población, además, no expuesta a inhibidores de PARP ni a platinos.

Aunque la prevalencia de las alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN puede variar en función del área geográfica analizada, este estudio confirma que *BRCA2* es el gen más frecuentemente alterado en una población de pacientes con CPRCm no seleccionada.

La presencia de mutaciones a nivel germinal en *BRCA2* tiene un impacto pronóstico negativo en los pacientes con CPRCm, que además puede verse condicionada por el tipo de tratamiento recibido en primera línea. Aunque son necesarios más estudios, si este hallazgo se confirma, las mutaciones germinales en *BRCA2* podrían suponer el primer biomarcador para seleccionar el tratamiento de primera línea en CPRCm.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejcancer.com

Original Research

Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline *BRCA2* mutation carriers

Rebeca Lozano ^{a,b,1}, Elena Castro ^{a,c,*,1}, Fernando Lopez-Campos ^d, Heather Thorne ^e, Miguel Ramirez-Backhaus ^f, Isabel M. Aragon ^a, Ylenia Cendón-Florez ^a, Ana Gutierrez-Pecharroman ^{a,g}, Daniela C. Salles ^h, Nuria Romero-Laorden ⁱ, David Lorente ^j, Pilar González-Peramato ^k, Ana Calatrava ^l, Concepción Alonso ^m, Urbano Anido ⁿ, Sara Arévalo-Lobera ^o, Judith Balmaña ^{p,q}, Isabel Chirivella ^r, María José Juan-Fita ^s, Gemma Llort ^t, Teresa Ramón y Cajal ^u, Elena Almagro ^v, Daniel Alameda ^a, Pedro P. López-Casas ^w, Bernardo Herrera ^{a,x}, Joaquin Mateo ^{p,q}, Colin C. Pritchard ^y, Emmanuel S. Antonarakis ^z, Tamara L. Lotan ^h, José Rubio-Briones ^f, Shahneen Sandhu ^{aa}, David Olmos ^w

^a Genitourinary Cancer Translational Research Unit, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain

^b Department of Medical Oncology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

^c Translational Cancer Genetics Group, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^d Department of Radiation Oncology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^e kConFab, The Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia

^f Urology Department, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

^g Department of Pathology, Hospital de Getafe, Getafe, Spain

^h Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA

ⁱ Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

^j Medical Oncology Department, Hospital Provincial de Castellón, Castellón de la Plana, Spain

^k Pathology Department, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^l Pathology Department, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

^m Genetics Department, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

ⁿ Medical Oncology Department, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

^o Medical Oncology Department, Hospital Universitario de Donostia, Donostia, Spain

^p Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain

^q Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

^r Medical Oncology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain

^s Medical Oncology Department, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

^t Medical Oncology Department, Parc Taulí Hospital Universitari, Sabadell, Spain

* Corresponding author at: Department of Medical Oncology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Av Cordoba s/n, 28041 Madrid, Spain.

E-mail addresses: ecastro.imas12@h12o.es, elena.castro@ibima.eu (E. Castro).

¹ Joint first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.02.022>

0959-8049/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{††} Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^{†††} Medical Oncology Department, Hospital Universitario Quirón, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^{††††} Genomics and Therapeutics in Prostate Cancer Group, Medical Oncology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Sanitaria 12 de Octubre (Imas12), Madrid, Spain

^{†††††} Urology Department, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

^{††††††} Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, USA

^{†††††††} Department of Medical Oncology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA

^{††††††††} Sir Peter MacCallum Department of Oncology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia

Received 7 December 2022; Received in revised form 21 February 2023; Accepted 22 February 2023

Available online 5 March 2023

KEYWORDS

Prostate cancer;
Germline;
BRCA2;
Survival outcomes;
Disease progression

Abstract Background: Several studies have reported the association of germline *BRCA2* (*gBRCA2*) mutations with poor clinical outcomes in prostate cancer (PCa), but the impact of concurrent somatic events on *gBRCA2* carriers survival and disease progression is unknown.

Patients and methods: To ascertain the role of frequent somatic genomic alterations and histology subtypes in the outcomes of *gBRCA2* mutation carriers and non-carriers, we correlated the tumour characteristics and clinical outcomes of 73 *gBRCA2* and 127 non-carriers. Fluorescent *in-situ* hybridisation and next-generation sequencing were used to detect copy number variations in *BRCA2*, *RBI*, *MYC* and *PTEN*. Presence of intraductal and cribriform subtypes was also assessed. The independent impact of these events on cause-specific survival (CSS), metastasis-free survival and time to castration-resistant disease was assessed using cox-regression models.

Results: Somatic *BRCA2-RBI* co-deletion (41% versus 12%, $p < 0.001$) and *MYC* amplification (53.4% versus 18.8%, $p < 0.001$) were enriched in *gBRCA2* compared to sporadic tumours. Median CSS from diagnosis of PCa was 9.1 versus 17.6 years in *gBRCA2* carriers and non-carriers, respectively (HR 2.12; $p = 0.002$). Median CSS in *gBRCA2* carriers increased to 11.3 and 13.4 years in the absence of *BRCA2-RBI* deletion or *MYC* amplification, respectively. Median CSS of non-carriers decreased to 8 and 2.6 years if *BRCA2-RBI* deletion or *MYC* amplification were detected.

Conclusions: *gBRCA2*-related prostate tumours are enriched for aggressive genomic features, such as *BRCA2-RBI* co-deletion and *MYC* amplification. The presence or absence of these events modify the outcomes of *gBRCA2* carriers.

© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is a heterogeneous disease driven by multiple genomic events [1,2]. Alterations in *BRCA2* have been described in 3–5% of localised tumours and in up to 9% of metastatic PCa [1–3] being usually early events already present in the primary tumour [4]. Importantly, half of them are germline in origin [5,6]. Both germline and somatic *BRCA2* alterations predict favourable responses to PARP inhibitors [3,7], but while the prognostic implications of somatic *BRCA2* alterations remain unclear [8–12], germline *BRCA2* (*gBRCA2*) mutations have been consistently identified as a marker of poor outcomes in PCa. *gBRCA2* mutations have been associated with frequent Gleason grade group reclassification during active surveillance [8]; short metastasis-free survival (MFS) in patients with localised disease [10]; early development of castration resistance [11,12] and reduced cause-specific survival

(CSS) [9,11,12]. The biological underpinnings of this aggressive behaviour have not been elucidated but could be related to the presence of certain histology subtypes and/or concurrent somatic events linked to genomic instability and poor PCa outcomes. *gBRCA2*-related PCa has been associated with intraductal (IDC) [13,14] and cribriform (CRIB) histology subtypes. [14] Copy number variations (CNV) predominantly deletions, are the most frequent genomic events in *BRCA2*-deficient tumours [15–17]. In an earlier report, we observed an enrichment in somatic *BRCA2*, *RBI* and *PTEN* deletions and *MYC* amplification in *gBRCA2*-related PCa using high-resolution comparative genomic hybridisation arrays [15]. A high incidence of somatic *BRCA2* loss, *RBI* deletions and *MYC* amplification in these tumours has also been reported by other groups [5,17–19].

However, none of the studies addressing the prognostic impact and clinical implications of *gBRCA2*

mutations in PCa [9–12,20,21] have taken into consideration histology subtypes or concurrent genomic events.

2. Materials and methods

2.1. Study design

PROREPAIR-A is a multicentre observational study that enrolled PCa patients previously screened for germline mutations in DNA damage and repair (DDR) genes in the context of other research protocols or as routine clinical practice. The study includes known carriers and non-carriers, irrespective of disease stage at diagnosis. Only patients harbouring pathogenic or likely pathogenic variants in *BRCA2* according to the American College of Medical Genetics and Genomics guidelines and ClinVar annotations were considered for this analysis (Suppl. Table 1). Each *gBRCA2* carrier was initially matched with two sporadic cases (without germline DDR mutations) by Gleason grade group and presence/absence of metastases at diagnosis. Eligibility required availability of archival diagnostic formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material, baseline diagnostic characteristics and outcomes (Fig 1).

The primary aim of the study was to confirm the prognostic value of *gBRCA2* for CSS, defined as time from diagnosis of PCa to death from the disease. Secondary objectives intended to establish the association between *gBRCA2* and CNV in *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* and *MYC*, as well as the impact of these somatic events in CSS, MFS and time to castration-resistant disease (TTCR) for *gBRCA2* carriers and non-carriers.

The study commenced in January 2013. Patient outcomes were retrospectively collected until July 2016 and prospectively collected afterwards, until the data cut-off in March 2020. The study was granted approval by the local institutional review boards at the participating sites.

2.2. Molecular and histological characterisation of tumour samples

Tumour blocks were collected under the study protocol and centrally reviewed by two pathologists (AGP, PGP) who marked tumour areas amenable for subsequent studies. These were prioritised according to availability for: i) cytogenetic studies; ii) next-generation sequencing (NGS).

We determined *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* and *MYC* somatic copy number status by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) using the methods previously described [23–25] with directly labelled bacterial artificial chromosomes from previously published assays and/or commercial diagnostic probes (Suppl. Figure 1). Then, multi-colour high-resolution images were obtained from the hybridised slides using the ARIOL SL-

50 platform (Leica) and scored by three trained operators (EC, RL, FLC) in a minimum of 100 nuclei per slide. *BRCA2*, *RBI*, and *PTEN* genes were classified as mono- or bi-allelic loss if 1 or 2 copies were deleted in at least 50% of evaluable cells. *MYC* gain was defined as a *MYC*:CEP8 signal ratio of $\geq 1.5:1$ and *MYC* amplification as *MYC*:CEP8 $\geq 2.2:1$ in $> 20\%$ of cells, respectively [26].

We compared CNV in *BRCA2*, *RBI*, *MYC* and *PTEN* determined by FISH and NGS in samples with good DNA quality and quantity amenable for whole-exome sequencing or targeted sequencing with the UW-OncoPlex panel [27] (Fig. 1, Suppl. Table 2).

Finally, two expert uropathologists (DSC and TLL) blinded to mutational status independently scored those cases with tumour tissue available ($n = 151$) for the presence of IDC and CRIB patterns with the support of immunostaining for basal cell markers [14].

2.3. Statistical methods

The required sample size was calculated based on the expected odds ratio for the 10-year CSS rate in *gBRCA2* carriers and non-carriers [28]. We estimated a 10-year CSS rate of $\leq 40\%$ and $\geq 70\%$ for *gBRCA2* carriers and non-carriers, respectively [11]. Considering a two-sided significance level of 5%, a power of 90% and a 1 carrier: 2 non-carriers matching ratio, at least 141 patients were required for the primary endpoint analysis. Initially, 240 patients were enrolled, but tissue and/or follow up data were not available for 40 patients who were excluded from the study. Nonetheless, this attrition in cases did not result in significant imbalances (Table 1).

Descriptive statistics were used to summarise patients and samples characteristics. The association, correlation and concordance between germline status, presence of somatic CNV and histology subtypes were analysed using the Chi-squared test, Pearson correlation and Cohen's Kappa, respectively. Other associations between patient/tumour characteristics and germline status were analysed using chi-squared, Mantel-Haenszel linear-trend or the Mann-Whitney U tests, as appropriate. All time-to-events were defined from initial PCa diagnosis and assessed using the Kaplan-Meier method. The resulting survival curves were compared using a log-rank test. Univariable and multivariable HR were calculated using Cox proportional-hazards models. All *p* values were two-sided. Analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences for Windows version 19 (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

A total of 200 patients were included (73 *gBRCA2* and 127 non-carriers) of which 24.8% presented metastasis at diagnosis (28.8% carriers versus 22% non-carriers,

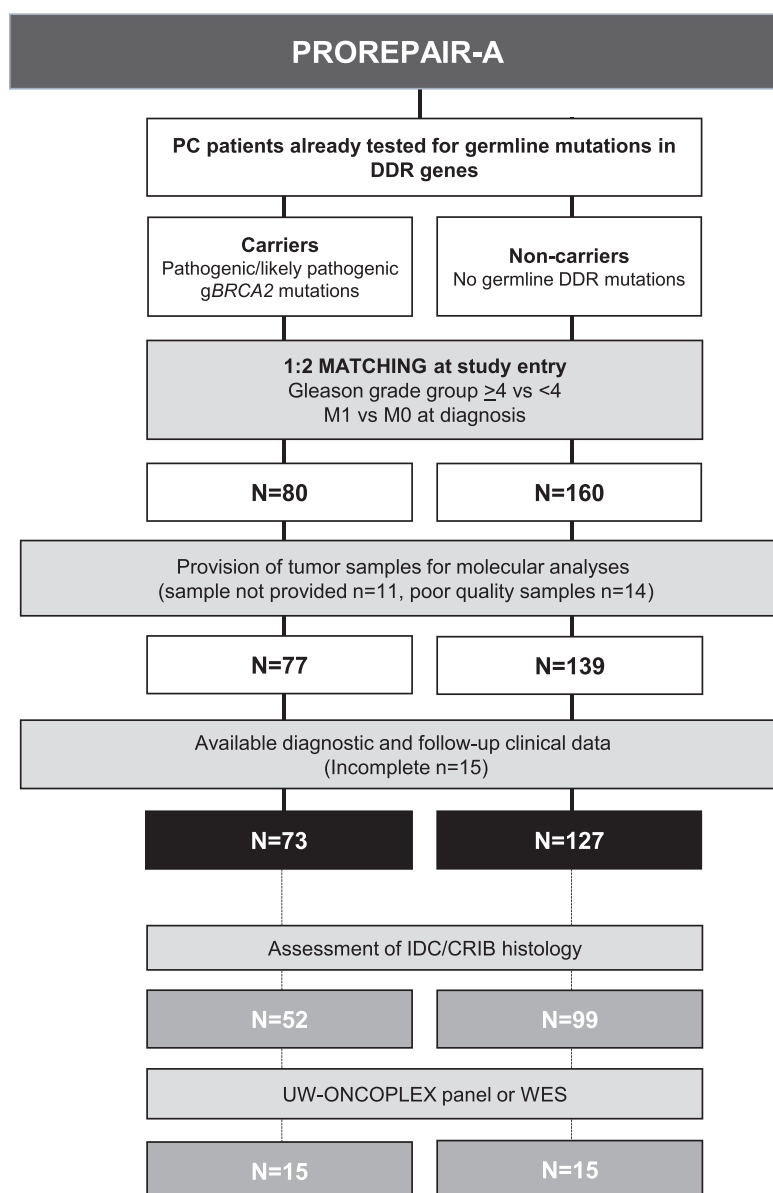


Fig. 1. Study flow-chart. CRIB = cribriform; g *BRCA2* = germline *BRCA2*; IDC = intraductal; PCa = prostate cancer; WES = whole exome sequencing. UW-OncoPlex™ Cancer gene Panel <https://testguide.labmed.uw.edu/public/view/OPX>.

$p = 0.287$). The only significant differences between carriers and non-carriers were median age at diagnosis (64.5 versus 62.6 years, $p = 0.028$) and a higher frequency of T3/T4 stage among *gBRCA2* carriers (31.5% versus 9.4%; $p < 0.001$). Patients' characteristics are summarised in Table 1.

3.1. Molecular characteristics and histology of tumours from *gBRCA2* carriers and non-carriers

Somatic *BRCA2* deletions as detected by FISH were present in 31 tumours from *gBRCA2* carriers (42.5%, 29 heterozygous and 2 homozygous) and 15 from non-

Table 1
Baseline characteristics of patients included in the study.

	Non-carriers (N = 127)	<i>gBRCA2</i> (N = 73)	p Value
Age at diagnosis			
Median, years (range)	64.5 (51.1–82.7)	62.6 (43.9–82.1)	0.028
PSA at diagnosis			
Median, ng/mL (range)	12.9 (1.5–578.0)	9.0 (0–3380)	0.077
Clinical/pathological stage			
T1/T2	115 (90.6%)	50 (68.5%)	< 0.001
T3/T4	12 (9.4%)	23 (31.5%)	
Node involvement			
N0	122 (96.1%)	65 (89%)	0.073
N1	5 (3.9%)	8 (11%)	
Metastases at diagnosis			
M0	99 (78.0%)	52 (71.2%)	0.287
M1	28 (22%)	21 (28.8%)	
Gleason grade group			
≤ 3	55 (43.3%)	31 (42.5%)	0.908
≥ 4	72 (56.7%)	42 (57.5%)	
Local treatment			
No primary therapy	25 (19.7%)	22 (30.1%)	0.137
RP	84 (66.1%)	37 (50.7%)	
RT	18 (14.2%)	11 (15.1%)	
Unknown	0	3 (4.1%)	
Somatic <i>BRCA2</i> deletion by FISH			
No alteration	112 (88.2%)	40 (54.8%)	< 0.001
<i>BRCA2</i> deletion	15 (11.8%)	31 (42.5%)	
Heterozygous	13 (10.2%)	29 (39.7%)	
Homozygous	2 (1.6%)	2 (2.7%)	
Undetermined	0	2 (2.7%)	
<i>RBI</i> status by FISH			
No alteration	100 (78.7%)	33 (45.2%)	< 0.001
<i>RBI</i> deletion	27 (21.3%)	40 (54.8%)	
Heterozygous	18 (14.2%)	36 (49.3%)	
Homozygous	9 (7.1%)	4 (5.5%)	
<i>BRCA2-RBI</i> co-deletion by FISH			
No	100 (78.7%)	32 (43.8%)	< 0.001
<i>BRCA2</i> deletion only	0	1 (1.4%)	
<i>RBI</i> deletion only	12 (9.4%)	8 (11.0%)	
<i>BRCA2-RBI</i> co-deletion	15 (11.8%)	30 (41.1%)	
Undetermined	0	2 (2.7%)	
<i>MYC</i> status by FISH			
No alteration	103 (81.1%)	32 (43.9%)	< 0.001
<i>MYC</i> amplification	12 (9.4%)	35 (47.9%)	
<i>MYC</i> gain	12 (9.4%)	4 (5.5%)	
Undetermined	0	2 (2.7%)	
<i>PTEN</i> status by FISH			
No alteration or heterozygous deletion	93 (73.2%)	46 (63.1%)	0.213
<i>PTEN</i> homozygous deletion	34 (26.8%)	25 (34.2%)	
Undetermined	0	2 (2.7%)	
Histology features (n = 151)	(n = 99)	(n = 52)	
Intraductal	45 (45.5%)	21 (40.4%)	0.550
Cribriform	44 (44.4%)	28 (53.8%)	0.272
Intraductal and/or cribriform	56 (56.6%)	30 (57.7%)	0.894

Percentage distribution across each variable include patients with unknown or missing values who were excluded for statistical hypothesis testing patients.

FISH, fluorescence in situ hybridisation; *gBRCA2*, germline *BRCA2*; N/A, not applicable; PSA, prostate-specific A antigen; RP, radical prostatectomy; RT, radiotherapy.

carriers (11.8%, 13 heterozygous and 2 homozygous) ($p < 0.001$). *RBI* deletions (54.8% versus 21.3%, $p < 0.001$) and *MYC* amplification (53.4% versus 18.8%, $p < 0.001$) were also more frequent in *gBRCA2* than in sporadic tumours (Table 1).

BRCA2 and *RBI* were frequently co-deleted in all groups. In 49 out of 51 tumours with somatic *BRCA2* deletion a concurrent *RBI* deletion was noted, with a strong correlation between these two alterations ($p = 0.001$, concordance Kappa index 0.74, Suppl. Table 3). *BRCA2-RBI* co-deletion was more frequent in *gBRCA2* than in sporadic tumours (41.1% versus 11.8%, $p < 0.001$) (Table 1). Primary tumours of patients presenting with metastatic disease at diagnosis (from carriers and non-carriers) were enriched for somatic *BRCA2-RBI* co-deletion (34% versus 21%, $p < 0.01$) and *MYC* amplification (42% versus 16%, $p < 0.001$) compared with those who presented with localised disease (Suppl. Figure 2).

The concordance in CNV detected by FISH and NGS was analysed in a subset of 30 tumours using the Cohen's Kappa concordance index. Kappa's linear weighted values ranged from substantial to almost perfect agreement for the genes explored: 0.801 (IC 95% 0.584–1.000) for somatic *BRCA2* deletions, 0.708 (IC 95% 0.483–0.934) for *RBI* deletions, 0.694 (IC 95% 0.483–0.905) for *PTEN* deletions and 0.627 (IC 95% 0.350–0.904) for *MYC* alterations (Suppl. Table 2).

The presence of IDC and CRIB patterns was assessed in 151 tumours (52 *gBRCA2* and 99 sporadic tumours). IDC and/or CRIB were present in 57.7% of *gBRCA2* and 56.6% of sporadic tumours. IDC was frequently associated with somatic *PTEN* loss, whilst CRIB was associated with somatic *BRCA2* and *RBI* loss as well as *MYC* amplification (Suppl. Table 3). IDC and/or CRIB morphologies were significantly more frequent in tumours with the *BRCA2-RBI* co-deletion (67.6% versus 41.9%, $p = 0.008$).

3.2. Clinical outcomes based on *gBRCA2* status

After a median follow-up of 12.0 years (95% CI, 11.5–12.6), 86 PCa-related deaths occurred: 45 in *gBRCA2* carriers and 34 in non-carriers. At the time of data cut-off, 142 patients (excluding censored carriers and non-carriers) were eligible for the primary endpoint analysis. The 10-year CSS rate was significantly inferior in *gBRCA2* patients than in non-carriers (26.8% versus 66.1%, $p < 0.001$). Median CSS from diagnosis of PCa was significantly shorter in *gBRCA2* carriers than in non-carriers when all patients were considered (9.1 versus 17.6 years; HR 2.12; 95% CI 1.33–3.33; $p = 0.002$), but also when the analysis was limited to M0 patients (11.3 years versus not-reached, HR 3.71 95%CI 1.87–7.36, $p < 0.001$) (Table 2, Fig. 2).

During the follow-up, 29.8% of patients with M0 disease at diagnosis developed metastases. This occurred

significantly earlier in *gBRCA2* carriers (8.6 years versus not-reached, HR 3.94 95%CI 2.12–7.32, $p < 0.001$). Likewise, TTCR was shorter in *gBRCA2* carriers (8.8 years versus not-reached, HR 1.88, 95%CI 1.20–2.96; $p = 0.005$) (Table 2, Fig. 2).

3.3. Clinical outcomes based on somatic alterations and histology subtypes

Somatic *BRCA2*, *RBI* deletions, *BRCA2-RBI* co-deletion, as well as *MYC* amplification and *MYC* gain determined by FISH were significantly associated with shorter CSS and TTCR in the univariate analysis of the entire study population (*gBRCA2* and sporadic tumours). Likewise, these genomic events and *PTEN* loss were also correlated with CSS, TTCR and MFS in the group of patients with localised disease at diagnosis (Table 2, Suppl. Table 5). Similar association with poor outcomes, in the entire cohort and in patients with localised disease only was observed in cases with either IDC or CRIB patterns (Table 2, Suppl. Table 5).

3.4. Multivariable cox-regression analyses

Multivariable analyses (MVA) confirmed the independent prognostic value of *gBRCA2* mutations as predictor of CSS (HR 3.92, $p = 0.009$) in the entire cohort. Other variables independently associated with shorter CSS were somatic *BRCA2-RBI* co-deletion (HR 4.0, $p = 0.009$), *MYC* amplification (HR 2.57, $p = 0.037$), metastasis at diagnosis (HR 12.37, $p < 0.001$) and Gleason grade group ≥ 4 (HR 6.0, $p < 0.001$) (Table 3). Among M0 patients, *gBRCA2* (HR 6.30, $p = 0.009$), *BRCA2-RBI* codeletion (HR 7.49, $p = 0.004$) and Gleason grade group ≥ 4 (HR 7.85, $p = 0.001$) were also associated CSS. IDC and CRIB patterns were not associated with CSS in the MVA (Suppl. Table 6).

Independent prognostic factors for MFS in the M0 cohort included *gBRCA2* mutations (HR 5.56, $p < 0.001$), somatic *BRCA2-RBI* co-deletion (HR 5.99, $p < 0.001$) Gleason grade group ≥ 4 ($p = 0.001$), T3/T4 ($p = 0.019$), N1 (HR 2.63, $p = 0.029$) and CRIB (HR 3.78, $p = 0.028$) *gBRCA2* mutations (HR 3.73, $p = 0.011$) and *BRCA2-RBI* co-deletion (HR 2.92 $p = 0.048$) also predicted shorter TTCR. Other poor prognostic factors for TTCR included Gleason grade group ≥ 4 (HR 2.72, $p = 0.002$), high PSA levels at diagnosis (HR 2.72 $p = 0.021$) and metastatic stage (9.38, $p < 0.001$) (Table 3, Supl. Table 5).

3.5. Impact of somatic *BRCA2-RBI* co-deletion and *MYC* amplification on Cause Specific Survival by *gBRCA2* status

As both, *BRCA2-RBI* co-deletion and *MYC* amplification, were independently associated with shorter CSS,

Table 2
Univariate analysis of outcomes by group. All patients and non-metastatic (M0).

Variable in the UVA	All stages patients (n = 200)					Non-metastatic (M0) only (n = 151)						
	Cause-specific survival		Time to castration resistance			Cause-specific survival in M0		Metastases-free survival				
	Median CSS	UVA HR (95% CI)	p Value	Median TTCR	UVA HR (95% CI)	p Value	Median TTCR	UVA HR (95% CI)	p Value	Median MFS	UVA HR (95% CI)	p Value
Germline BRCA2 status												
<i>gBRCA2</i> non-carrier	9.1	2.06 (1.30–3.27)	0.002	8.8	1.88 (1.20–2.96)	0.005	11.3	3.71 (1.87–7.36)	< 0.001	8.6	3.94	< 0.001
versus	17.5						versus NR			versus NR	(2.12–7.32)	
Somatic BRCA2 status												
<i>BRCA2</i> deletion	6.3	3.04 (1.90–4.86)	< 0.001	4.7	3.04 (1.91–4.86)	< 0.001	11.3	4.56 (2.26–9.20)	< 0.001	8.1	4.71	< 0.001
versus no	16.9						versus NR			versus NR	(2.48–8.93)	
Heterozygous deletion	6.6	2.90 (1.73–4.85)	< 0.001	5.0	2.65 (1.29–5.44)	< 0.001	12.6	5.06	< 0.001	8.5	5.15	< 0.001
versus	16.9						versus NR			versus NR	(2.10–12.67)	
normal												
Homozygous deletion	5.7	2.02 (1.05–3.90)	0.035	4.8	2.42 (0.94–6.20)	0.066	11.0	1.45 (0.54–3.88)	0.461	7.8	1.65	0.246
versus	16.9						versus NR			versus NR	(0.71–3.82)	
normal												
<i>RBI</i> status												
<i>RBI</i> loss	9.8	2.05 (1.31–3.20)	0.002	9.0	1.89 (1.21–2.95)	0.005	11.8	3.19 (1.65–6.16)	0.001	9.3	3.70	< 0.001
versus no	16.9						versus 17.6			versus NR	(2.04–6.68)	
Heterozygous deletion	9.9	1.83 (1.15–2.90)	0.010	9.0	1.72 (1.01–2.73)	0.020	11.8	3.36 (1.67–6.75)	0.001	9.5	3.45	< 0.001
versus	16.9						versus 17.6			versus NR	(1.91–6.24)	
normal												
Homozygous deletion	10.9	1.89 (0.86–4.19)	0.117	8.7	1.77 (0.80–3.90)	0.159	11.3	2.58 (0.75–8.91)	0.134	10.2	1.97	0.272
versus	16.9						versus 17.6			versus NR	(0.59–6.55)	
normal												
<i>BRCA2-RBI</i> co-deletion												
<i>BRCA2-RBI</i> co-deletion	6.3	2.95 (1.84–4.73)	< 0.001	4.7	3.01 (1.88–4.82)	< 0.001	9.9	4.63 (2.29–9.33)	< 0.001	8.1	4.60	< 0.001
versus no	16.9						versus NR			versus NR	(2.44–8.67)	
<i>MYC</i> status												
<i>MYC</i> amplification	6.0	5.25 (3.25–8.50)	< 0.001	2.9	4.78 (2.95–7.76)	< 0.001	9.0	14.70	< 0.001	8.8	4.83	< 0.001
versus no	17.6						versus NR			versus NR	(2.51–9.31)	
<i>MYC</i> gain												
<i>MYC</i> gain	12.6	2.56 (1.31–4.99)	0.006	10.7	2.79 (1.47–5.30)	0.002	12.6	2.66 (0.97–7.28)	0.057	10.7	2.53	0.003
versus no	17.6						versus NR			versus NR	(1.04–6.14)	
<i>PTEN</i> status												

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Variable in the UVA	All stages patients (n = 200)				Non-metastatic (M0) only (n = 151)				
	Cause-specific survival		Time to castration resistance		Cause-specific survival in M0		Metastases-free survival		
	Median CSS	UVA HR (95% CI)	p Value	Median TTCR	UVA HR (95% CI)	p Value	Median MFS	UVA HR (95% CI)	p Value
Homozygous deletion versus no	10.7	1.46 (0.93–2.30)	0.104	10.7	1.51 (0.96–2.36)	0.076	12.6	1.91	0.033
Heterozygous deletion versus normal	15.0	0.52 (0.24–1.11)	0.092	NR	0.88 (0.24–1.10)	0.516	17.6	1.62	0.239
Age at diagnosis > 65 years	12.6	1.52 (0.97–2.37)	0.068	NR	1.16 (0.74–1.80)	0.523	12.5	1.13	0.695
PSA at diagnosis Above median	16.2	2.36 (1.16–4.19)	0.015	15.5	3.98 (1.84–8.58)	< 0.001	16.9	1.39	0.335
Gleason grade ≥ 4	8.0	6.15 (3.32–11.4)	< 0.001	4.7	6.10 (3.36–11.07)	< 0.001	12.6	3.09	< 0.001
N1 at diagnosis	5.6	2.31 (1.15–4.64)	0.019	3.6	1.90 (0.91–3.94)	0.086	7.6	2.86	0.017
Clinical/pathological stage T3/T4 versus T1/T2	11.3	1.47 (0.87–2.49)	0.155	8.8	1.52 (0.90–2.57)	0.120	12.7	4.06	< 0.001
M1 at diagnosis	3.1	20.75 (11.83–36.38)	< 0.001	1.2	24.1 (13.67–42.50)	< 0.001	–	–	–
Histology variants	All stages patients (n = 151)								
IDC	Non-metastatic (M0) only (n = 122)								
Yes versus no	11.8	1.92 (1.13–3.28)	0.016	13.0	1.91 (1.11–3.27)	0.019	14.9	2.36	0.029
CRIB	11.3	2.55 (1.43–4.54)	0.001	9.0	2.71 (1.52–4.82)	0.001	14.9	4.90	0.001
CRIB versus no	11.3	2.55 (1.43–4.54)	0.001	9.0	2.71 (1.52–4.82)	0.001	14.9	4.97	< 0.001

CRIB, cribriform; gBRCA2, germline BRCA2; CSS, cause-specific survival; IDC, intraductal; MFS, metastasis-free survival; NR, not reached; PSA, prostate-specific antigen; TTCR, time to castration resistant disease.

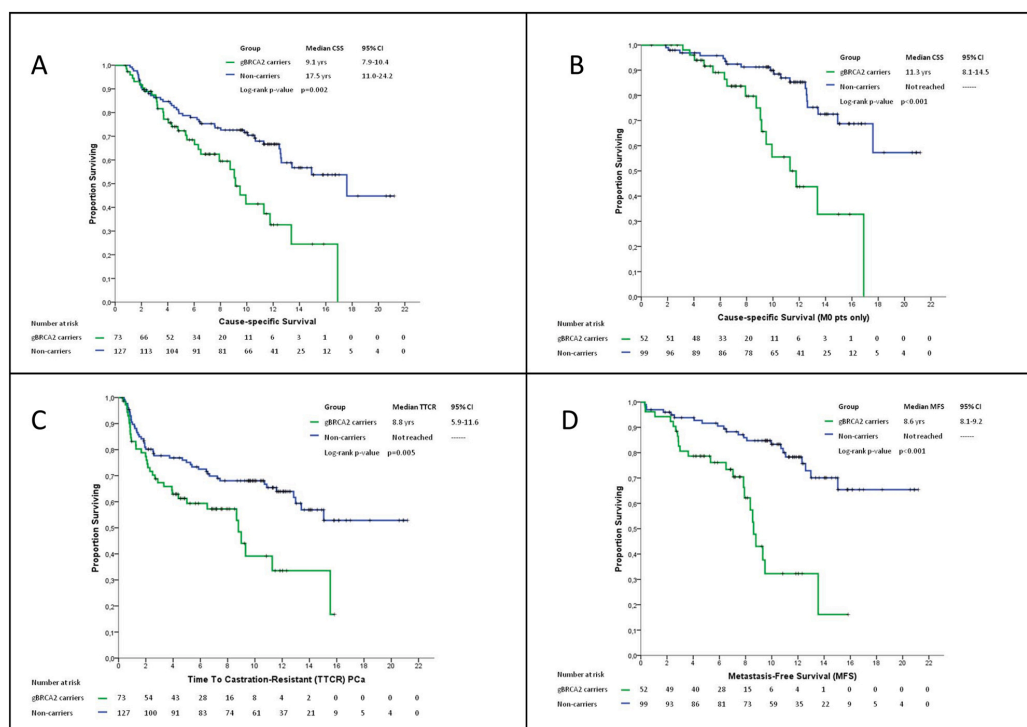


Fig. 2. Cause-specific survival (CSS), metastases-free survival (MFS) and time to castration-resistant disease (TTCR) from diagnosis of prostate cancer in *gBRCA2* mutation carriers and non-carriers. Kaplan-Meier curves in *gBRCA2* versus non-carriers for: (A) CSS; (B) CSS in M0 patients; (C) TTCR; (D) MFS in M0 patients. *gBRCA2* = germline *BRCA2*; M0 = patients with no evidence of distant metastases at diagnosis.

we analysed whether these somatic events may affect the outcomes of PCa patients by *gBRCA2* status.

Among *gBRCA2* patients the presence of somatic *BRCA2-RBI* co-deletion (6.3 versus 11.3 years, $p = 0.041$, Fig. 3A) or *MYC* amplification (6.0 versus 13.4 years, $p < 0.001$, Fig. 3B) was associated with shorter CSS. Similar associations were also noted in the non-carrier population for *BRCA2-RBI* co-deletion (8 years versus NR years, $p < 0.001$, Fig. 3C) and *MYC* amplification (2.6 years versus NR, $p < 0.001$, Fig. 3D).

4. Discussion

Our results confirm the negative prognostic value of *gBRCA2* mutations for MFS, TTCR and CSS and the enrichment of somatic *BRCA2* loss, *RBI* loss, *BRCA2-RBI* co-deletion and *MYC* amplification in *gBRCA2*-related PC, suggesting that *gBRCA2* mutations associate with an aggressive tumour genotype. Importantly, we have observed that the presence/absence of concurrent genomic events modify the prognosis of *gBRCA2* carriers. Median CSS of *gBRCA2* carriers in our series was 9.1 years, but it rose to 11.3

and 13.4 years in the absence of *BRCA2-RBI* deletion or *MYC* amplification, respectively. Likewise, median CSS in non-carriers was 17.6 years, but decreased to 8 and 2.6 years if *BRCA2-RBI* co-deletion or *MYC* amplification were detected. Our data suggest that the outcomes of carriers and non-carriers seem to be remarkably more similar when tumour variables associated with aggressive PCa phenotypes are considered.

BRCA2 and *RBI* are located on chromosome 13q, 16 Mb apart, and concomitant deletion (homozygous and heterozygous) of the two genes is frequently reported in PCa [19,29]. *BRCA2-RBI* co-deletion has been associated with aggressive biology and enhanced genome instability in pre-clinical models [24]. Here, we show for the first time that this event correlates with shorter CSS, MFS and TTCR in PCa and that it is significantly more frequent in *gBRCA2*-related tumours.

Risbridger et al. [13] have described an increased incidence of IDC in *gBRCA2*-related PCa that we were not able to confirm in a larger series [14], although we noted an association between the presence of IDC and/or CRIB histologies and bi-allelic *BRCA2* alterations regardless of their somatic or germline origin [14]. In the

Table 3
Multivariate analysis (MVA) for Cause specific survival, metastasis free survival and time to castration resistance. All patients and non-metastatic (M0).
Variable in the MVA

Variable in the MVA	All stages patients (n = 198*)			Non-metastatic (M0) patients (n = 151)		
	Cause-specific survival		Time to castration resistance	Cause-specific survival		Metastasis-free survival
	MVA HR (95% CI)	p Value	MVA HR (95% CI)	MVA HR (95% CI)	p Value	MVA HR (95% CI)
Germline <i>BRC A2</i> status						
<i>gBRC A2</i> versus non-carrier	3.92 (1.40–10.93)	0.009	3.73 (1.29–10.77)	6.30 (1.59–24.92)	0.009	5.56 (1.57–19.75)
<i>RBI</i> status						
<i>RBI</i> deletion versus no	0.91 (0.18–4.58)	0.914	0.77 (0.16–3.89)	0.59 (0.07–5.35)	0.643	0.45 (0.05–3.96)
<i>BRC A2-RBI</i> co-del						
<i>BRC A2-RBI</i> co-del versus no	4.01 (1.42–11.34)	0.009	2.92 (1.01–8.45)	7.49 (1.89–29.78)	0.004	5.99 (1.63–22.08)
<i>MYC</i> status						
<i>MYC</i> amplification versus no	2.57 (1.06–6.25)	0.037	2.21 (0.85–5.73)	2.74 (0.79–9.53)	0.114	1.91 (0.61–5.95)
<i>MYC</i> gain versus no	1.82 (0.59–5.66)	0.299	2.21 (0.73–6.73)	1.51 (0.35–6.42)	0.578	1.95 (0.48–7.87)
<i>PTEN</i> loss						
<i>PTEN</i> homdel versus no	1.03 (0.51–2.07)	0.930	1.07 (0.51–2.23)	1.08 (0.44–2.66)	0.868	1.95 (0.48–2.72)
Age at diagnosis						
> 65 versus ≤ 65 years	0.87 (0.45–1.68)	0.684	0.99 (0.95–1.03)	0.91 (0.40–2.09)	0.831	0.58 (0.12–2.87)
PSA at diagnosis						
Above versus below median	1.46 (0.65–3.26)	0.355	2.72 (1.16–6.35)	1.94 (0.79–4.77)	0.148	2.19 (0.85–5.65)
Gleason grade group						
≥ 4 versus ≤ 3	6.00 (2.21–16.27)	< 0.001	4.51 (1.72–11.83)	7.85 (2.41–25.61)	0.001	5.96 (2.34–15.17)
Clinical/pathological stage						
T3/T4 versus T1/T2	0.99 (0.44–2.22)	0.977	1.00 (0.44–2.25)	1.61 (0.62–4.16)	0.331	3.01 (1.33–6.82)
N1 at diagnosis						
Yes versus no	0.96 (0.30–3.10)	0.952	0.84 (0.25–2.75)	1.14 (0.24–5.52)	0.867	2.63 (1.11–6.26)
M1 at diagnosis						
Yes versus no	12.37 (4.06–37.67)	< 0.001	9.38 (3.31–26.57)	–	–	–

co-del, co-deletion; *gBRC A2*, germline *BRC A2*; homdel, homozygous deletion; MVA, multivariate analysis; PSA, prostate-specific antigen.

*Two patients excluded from MVA due to incomplete data for the variables included in the MVA.

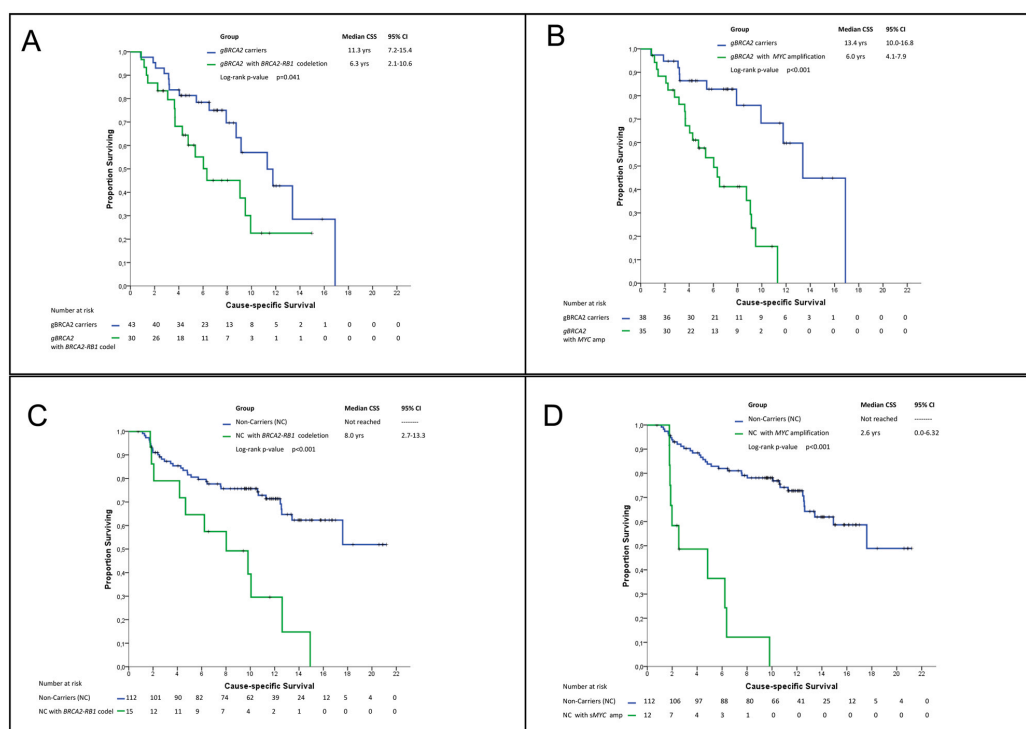


Fig. 3. Cause-specific survival (CSS) from diagnosis of prostate cancer in *gBRCA2* carriers and non-carriers by somatic *BRCA2-RB1* co-deletion and *MYC* amplification. Kaplan-Meier curves for CSS: (A) *gBRCA2* carriers with and without somatic *BRCA2-RB1* co-deletion; (B) *gBRCA2* carriers with and without *MYC* amplification; (C) non-carriers with and without somatic *BRCA2-RB1* co-deletion; (D) non-carriers with and without *MYC* amplification. amp = amplification; co-del = co-deletion; *gBRCA2* = germline *BRCA2*; NC = non-carriers.

current study, we have observed that IDC and CRIB patterns are enriched in tumours with *BRCA2-RB1* co-deletion and *MYC* amplification in both carriers and non-carriers. All these findings are in line with previous reports of an association between genomic instability and presence of IDC and CRIB in PCa [30]. Furthermore, IDC and CRIB histologies are poor prognosis factors in PCa [31] and Risbridger et al. [13] have already reported a negative impact of IDC on the survival of *gBRCA2* carriers. In our series, IDC and CRIB were both related with shorter CSS, MFS and TTCR in the univariate analysis; however, these associations did not remain significant when other factors, such as *BRCA2-RB1* co-deletion and *MYC* amplification, were considered in the multivariate analyses.

It has consistently been reported that 30–50% of archival FFPE samples fail NGS [32] and copy number calling is challenging in plasma samples with low circulating free DNA tumour fractions [33]. Thus, different approaches for genomic tumour profiling need to be explored. Before NGS became broadly available, FISH was routinely used to assess CNV and it was the method

of choice to validate copy number calls in early NGS studies [22]. FISH has recently been used to assess *RB1* CNVs [23] and *BRCA2-RB1* co-deletion [24]. Using FISH, we have been able to analyse CNV in the genes of interest in 94% of our samples. Concordance between NGS and FISH is affected by multiple parameters, including sequencing read depth and the variation size. We compared FISH and NGS results in a subset of tumours (n = 30), and found a strong concordance between both methods for the detection of *BRCA2* deletions and *BRCA2-RB1* co-deletion. This observation warrants further study as FISH could be a simple, fast and low-cost technique to identify *BRCA2* gene deletions which could be missed with other analytical approaches such as NGS from circulating tumour DNA if the tumour fraction is low.

Previous reports have described CNV as the most frequent event in *gBRCA2*-related PCa with enrichment in *BRCA2* and *RB1* deletions and *MYC* amplification [15–17]. A limitation of our study is that we did not analyse other alterations in these genes that could also result in a loss of function. Furthermore, an assessment

of global genomic instability would have been required for a more accurate analysis of the associations and correlations between genomic events. Future studies will be needed to understand how other tumour events affect the outcomes of *gBRCA2* carriers (i.e. *TP53* mutations [35], methylation patterns [17]).

In conclusion, our data suggest that the PCa outcomes of *gBRCA2* carriers are influenced by the presence/absence of concurrent tumour events known to impact PCa prognosis. When these events are considered, the prognosis of *gBRCA2* carriers and non-carriers seem to be more alike than previously reported. Integration of germline and somatic information would refine prognosis estimations and may contribute to design personalised management strategies for *gBRCA2* mutation carriers diagnosed with PCa.

Conflict of interest statement

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: R.L. declares speaker fees from Roche, Janssen, Sanofi and Bayer, and travel support from Roche, Janssen, Sanofi and Astellas Pharma, E.C. declares honoraria from AstraZeneca, Bayer, Clovis, Janssen, Pfizer and Roche, consulting or Advisory Roles for AstraZeneca, Bayer, Janssen, MSD and Pfizer, research funding from AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst) and Janssen (Inst) and travel support from AstraZeneca, Bayer and Janssen, F.L.-C. declares consulting or Advisory Role from Astella Pharma, speaker fees from Janssen, Astellas Pharma, Research Funding from Astellas Pharma (Inst) and travel support from Astellas Pharma and Janssen, C.L. declares honoraria from Roche and travel support from Astellas Pharma and Angelini, N.R.-L. declares speaker fees from MSD, consulting or Advisory Role from Ipsen, Astellas Pharma, Bayer, Tesaro, AstraZeneca and Sanofi, research funding from Janssen (Inst), and Pfizer (Inst) and travel support from Janssen, D.L. declares speaker fees from Janssen, Bayer, Astellas Pharma, Sanofi, Pfizer and BMS, consulting or Advisory Role from Sanofi, and travel support from Janssen, and Astellas Pharma, F.Z. declares expert testimony for Sanofi and travel support from Ipsen, J.M. declares consulting or advisory role from AstraZeneca, Janssen and Roche, speaker's bureau from Astellas Pharma, AstraZeneca and Sanofi and travel support from AstraZeneca, Ipsen and Sanofi, C.C.P. declares consulting or Advisory Role from AstraZeneca and Promega, E.S.A. declares honoraria and consulting or advisory role from Astellas, AstraZeneca, Clovis Oncology, Dendreon, ESSA,

Janssen Biothec, Medivation, Merck, Sanofi; Research Funding from Aragon Pharmaceuticals (Inst), Astellas (Inst), AstraZeneca (Inst), Clovis Oncology (Inst), Constellation Pharmaceuticals (Inst), Dendreon (Inst), Exelixis (Inst), Genentech (Inst), Janssen Biotech (Inst), Johnson&Johnson (Inst), Merck (Inst), Millennium (Inst), Novartis (Inst), Sanofi (Inst) and Tokai pharmaceuticals (Inst); co-inventor of a biomarker technology licensed to Quiagen, T.L. declares consulting or advisory role for Janssen and research funding from DeepBio and Ventana Medical Systems, J.R.-B. declares consulting or Advisory Role from Janssen, Astellas Pharma and Bayer, and Research Funding from HealthMDx (Inst), S.S. declares honoraria from Amgen, Bristol-Meyers Squibb, Merck, Merck Serono consulting or Advisory Role from AstraZeneca and Merck, research funding from AstraZeneca, Merck Sharp and Dohme, Amgen and Endocyte.

D.O. declares honoraria from Bayer, Janssen and Sanofi, consulting or Advisory Role from AstraZeneca, Bayer, Clovis, Daiichi-Sankyo, Janssen, MSD and Roche, research funding from Astellas (Inst), AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst), Genentech (Inst), Janssen (Inst), Medivation (Inst), MSD (Inst), Pfizer (Inst), F. Hoffman-Roche (Inst) and Tokai Pharmaceuticals (Inst) and travel support from Bayer, Ipsen, Janssen and Roche.

All remaining authors have declared no conflicts of interest.

Funding

This study was supported by grants from 'Instituto de Salud Carlos III' through projects PI19/01475 to EC; PI13/01287, PI16/01565 and PI19/01380 to DO as well as unrestricted grants from 'Fundación CRIS contra el Cáncer' and 'Sociedad Española de Oncología Médica' to EC and P19054OLMO grant from 'Fundación Científica de la AECC' to DO. Additional data used in this study were also generated as part of a Department of Defense awards W81XWH-18-1-0770 (PC170510P2) to DO, W81XWH-18-1-0756 to CCP, and W81XWH-18-1-0758 to JM.

'Instituto de Salud Carlos III' supported RL (CM17-00221), NRL (JR17/00007), and EC (JR18/00011) and 'Ministerio de Ciencia e Innovación' provided funding to IMA (FJCI-2016-28121), DO (RYC-2015-18625) and EC (JCI-2014-19129). DO is also supported by the CRIS Excellence in Research award 2019 from 'Fundación CRIS contra el Cáncer' (EXCELLENCE19-26). The Prostate Cancer Foundation Young Investigator Award programme has supported EC, JM, CCP, ESA, TLA and DO.

CRedit authorship contribution statement

RL, EC, and DO conceived and designed the study. RL, EC, FL-C, HT, MR-B, NR-L, DL, AC, CA, UA, SA-L, JB, IC, MJ JF, GL, TRyC, EA, BH, JR-B, SS and DO acquired the tissue samples and clinical data. AGP and PGP marked slides amenable for the histologic analysis and genomic studies. DCS and TLL scored samples for the presence of IDC and CRIB patters. EC, IMA, YC-F, DA, PL-C, JM and CCP prepared the samples and/or interpreted sequencing data. RL, FL-C and EC conducted and interpreted FISH results. RL, DL and DO performed the statistical analyses. EC, DO and RL wrote the manuscript in consultation with TL, EA, SS, JM and CCP. All authors provided critical feedback and approved the final version of the manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ejca.2023.02.022.

References

- [1] Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015;161:1215–28.
- [2] Armenia J, Wankowicz SAM, Liu D, et al. The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* 2018;50:645–51.
- [3] Hussain M, Mateo J, Fizazi K, et al. Survival with olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2020;383:2345–57.
- [4] Schweizer MT, Sivakumar S, Tukachinsky H, et al. Concordance of DNA repair gene mutations in paired primary prostate cancer samples and metastatic tissue or cell-free DNA. *JAMA Oncol* 2021;7:1–5.
- [5] Jonsson P, Bandlamudi C, Cheng ML, et al. Tumour lineage shapes BRCA-mediated phenotypes. *Nature* 2019;571:576–9.
- [6] Sokol ES, Pavlick D, Khiabani H, et al. Pan-cancer analysis of BRCA1 and BRCA2 genomic alterations and their association with genomic instability as measured by genome-wide loss of heterozygosity. *JCO Precis Oncol* 2020;4:442–65.
- [7] Abida W, Patnaik A, Campbell D, et al. Rucaparib in men with metastatic castration-resistant prostate cancer harboring a BRCA1 or BRCA2 gene alteration. *J Clin Oncol* 2020;38:3763–72.
- [8] Carter HB, Helfand B, Mamawala M, 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;75:743–9.
- [9] Castro E, Goh C, Olmos D, 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;31:1748–57.
- [10] Castro E, Goh C, Leongamornlert D, et al. Effect of BRCA mutations on metastatic relapse and cause-specific survival after radical treatment for localised prostate cancer. *Eur Urol* 2015;68:186–93.
- [11] Castro E, Romero-Laorden N, Del Pozo A, 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;37:490–503.
- [12] Annala M, Struss WJ, Warner EW, et al. Treatment outcomes and tumor loss of heterozygosity in germline DNA repair-deficient prostate cancer. *Eur Urol* 2017;72:34–42.
- [13] Risbridger GP, Taylor RA, Clouston D, 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* 2015;67:496–503.
- [14] Lozano R, Salles DC, Sandhu S, et al. Association between BRCA2 alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2021;147:74–83.
- [15] Castro E, Jugurnauth-Little S, Karlsson Q, et al. High burden of copy number alterations and c-MYC amplification in prostate cancer from BRCA2 germline mutation carriers. *Ann Oncol* 2015;26:2293–300.
- [16] Quigley DA, Dang HX, Zhao SG, et al. Genomic hallmarks and structural variation in metastatic prostate cancer. *Cell* 2018;174(758–769):e9.
- [17] Taylor RA, Fraser M, Livingstone J, et al. Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nat Commun* 2017;8:13671.
- [18] Kensler KH, Baichoo S, Pathania S, et al. The tumor mutational landscape of BRCA2-deficient primary and metastatic prostate cancer. *NPJ Precis Oncol* 2022;6:39.
- [19] Warner E, Herberts C, Fu S, et al. BRCA2, ATM, and CDK12 defects differentially shape prostate tumor driver genomics and clinical aggression. *Clin Cancer Res* 2021;27:1650–62.
- [20] Antonarakis ES, Lu C, Luber B, 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* 2018;74:218–25.
- [21] Mateo J, Cheng HH, Beltran H, et al. Clinical outcome of prostate cancer patients with germline DNA repair mutations: retrospective analysis from an international study. *Eur Urol* 2018;73:687–93.
- [22] Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol* 2013;63:920–6.
- [23] Nava Rodrigues D, Casiraghi N, Romanel A, et al. RB1 heterogeneity in advanced metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:687–97.
- [24] Chakraborty G, Armenia J, Mazu YZ, et al. Significance of BRCA2 and RB1 co-loss in aggressive prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2020;26:2047–64.
- [25] Lambros MB, Simpson PT, Jones C, 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;86:398–408.
- [26] Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, et al. Amplification of c-myc by fluorescence in situ hybridization in a population-based breast cancer tissue array. *Mod Pathol* 2001;14:1030–5.
- [27] Pritchard CC, Salipante SJ, Koehler K, et al. Validation and implementation of targeted capture and sequencing for the detection of actionable mutation, copy number variation, and gene rearrangement in clinical cancer specimens. *J Mol Diagn* 2014;16:56–67.
- [28] Casagrande JT, Pike MC. An improved approximate formula for calculating sample sizes for comparing two binomial distributions. *Biometrics* 1978;34:483–6.
- [29] Abida W, Cyrta J, Heller G, et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:11428–36.
- [30] Bottcher R, Kweldam CF, Livingstone J, et al. Cribriform and intraductal prostate cancer are associated with increased genomic instability and distinct genomic alterations. *BMC Cancer* 2018;18:8.

- [31] Kweldam CF, Kummerlin IP, Nieboer D, et al. Disease-specific survival of patients with invasive cribriform and intraductal prostate cancer at diagnostic biopsy. *Mod Pathol* 2016;29:630–6.
- [32] Hussain M, Corcoran C, Sibilla C, et al. Tumor genomic testing for > 4000 men with metastatic castration-resistant prostate cancer in the phase III trial PROfound (Olaparib). *Clin Cancer Res* 2022;28:1518–30.
- [33] Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, et al. Concordance of circulating tumor DNA and matched metastatic tissue biopsy in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017;109:djx118.
- [35] Deek MP, Van der Eecken K, Phillips R, et al. The mutational landscape of metastatic castration-sensitive prostate cancer: the spectrum theory revisited. *Eur Urol* 2021;80:632–40.

2.1. Resumen en castellano

“Impact of concurrent tumour events on the prostate cancer outcomes of germline BRCA2 mutation carriers”

Introducción, objetivos y metodología: Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la presencia de mutaciones germinales en *BRCA2* (*gBRCA2*) está asociada con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata. El racional biológico de este comportamiento agresivo no está totalmente dilucidado, aunque podría estar relacionado con la presencia de determinados eventos somáticos asociados a la inestabilidad genómica que presentan los tumores *gBRCA2*. Resultados previos han demostrado que estos tumores *gBRCA2* están enriquecidos en eventos somáticos como la delección de *BRCA2*, *RBI* y *PTEN* o la amplificación de *MYC*. Sin embargo, hasta el momento, se desconoce el impacto que puede suponer la presencia de otras mutaciones somáticas concurrentes en la supervivencia de pacientes *gBRCA2*.

PROREPAIR-A es un estudio observacional multicéntrico en el cual han participado 12 centros a nivel internacional. Se incluyeron pacientes con cáncer de próstata, tanto localizado como avanzado, con confirmación histológica y estado de mutación germinal para genes relacionados con la reparación del ADN previamente testado y conocido. Cada caso portador de mutación germinal en *BRCA2* fue inicialmente emparejado con 2 controles esporádicos (no portadores de alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN) en base al grupo de Gleason y la presencia/ausencia de enfermedad metastásica al diagnóstico. La disponibilidad de tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina, así como información sobre las características clínico-patológicas al diagnóstico fueron requisitos de elegibilidad.

El objetivo principal del estudio fue confirmar el valor pronóstico negativo de *gBRCA2* para la supervivencia causa-específica en pacientes con cáncer de próstata. Los objetivos secundarios fueron establecer la asociación entre mutaciones germinales en *BRCA2* y las variaciones en el número de copias (CNV por sus siglas en inglés: *copy number variation*) en los genes *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* y *MYC*, así como analizar el impacto de estas alteraciones somáticas en la supervivencia causa-específica, la supervivencia libre de metástasis y el tiempo a la resistencia a castración en pacientes *gBRCA2* versus no portadores.

La determinación somática de *BRCA2*, *RBI*, *PTEN* y *MYC* se realizó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*).

Resultados: Se incluyeron un total de 200 pacientes (73 *gBRCA2* y 127 no portadores). Los tumores de pacientes portadores de *gBRCA2* presentaron un mayor porcentaje de eventos somáticos en comparación con los no portadores. La pérdida de *BRCA2* y *RBI* de forma conjunta fue muy frecuente en ambos grupos de pacientes (en 49 de 51 tumores con pérdida somática de *BRCA2* se observó pérdida concurrente de *RBI*, con una correlación fuerte [$p=0.001$; índice Kappa de concordancia de 0,74]). La co-deleción de *BRCA2-RBI* (41% vs 12%, $p<0,001$) y la amplificación de *MYC* (53,4% vs 18,8%, $p<0,001$) se observaron de forma más frecuente en los tumores *gBRCA2* en comparación con los no portadores. De igual manera, estas alteraciones se observaron de forma más frecuente en pacientes con enfermedad metastásica *de novo* en comparación con enfermedad localizada al diagnóstico (co-pérdida de *BRCA2-RBI*; 34% vs 21%; $p<0,01$; amplificación de *MYC*; 42% vs 16%, $p<0,001$).

Tras una mediana de seguimiento de 12 años, la mediana de supervivencia causa-específica fue de 9,1 años para los pacientes *gBRCA2* frente a 17,6 años en no portadores (HR 2,12; $p=0,002$). De igual manera, la supervivencia libre de metástasis y el tiempo a la resistencia a la castración fueron significativamente más cortos en pacientes *gBRCA2* frente a no portadores (HR 3,94; IC95% 2,12-7,32; $p<0,001$; HR 1,88; IC95% 1,20-2,96; $p=0,005$, respectivamente). El análisis multivariable confirmó que la presencia de mutaciones *gBRCA2* es un factor pronóstico independiente para la supervivencia causa-específica (HR 3,02; $p=0,009$). La co-deleción somática de *BRCA2-RBI* (HR 4,0; $p=0,009$) y la amplificación de *MYC* (HR 2,57; $p=0,037$) también fueron variables asociadas de forma independiente con la supervivencia causa-específica. Por ello, se analizó el impacto que podrían suponer estos eventos somáticos en el pronóstico de pacientes *gBRCA2*. En estos pacientes (*gBRCA2*) la presencia de la co-pérdida somática de *BRCA2-RBI* (6,3 vs 11,3 años, $p=0,041$) o la amplificación de *MYC* (6,0 vs 13,4 años, $p<0,001$) se asociaron de forma significativa a una menor supervivencia causa-específica. De igual forma, estas alteraciones somáticas se asociaron a peor pronóstico en pacientes no portadores.

Conclusiones: Los tumores de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* presentan un mayor porcentaje de alteraciones somáticas que implican un

comportamiento clínico más agresivo, como son la co-delección de *BRCA2-RB1* y la amplificación de *MYC*. La presencia o ausencia de estas alteraciones somáticas modifica el pronóstico de los pacientes *gBRCA2*, por tanto, es importante integrar la información de análisis germinal y somático para determinar el pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata portadores de alteraciones *gBRCA2*.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejcancer.com

Original Research

Association between *BRCA2* alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer

Rebeca Lozano ^{a,b,1}, Daniela C. Salles ^{c,1}, Shahneen Sandhu ^d, Isabel M. Aragón ^{a,b}, Heather Thorne ^d, Fernando López-Campos ^{a,e}, José Rubio-Briones ^f, Ana M. Gutierrez-Pecharroman ^{a,g}, Laneisha Maldonado ^c, Tomas di Domenico ^h, Alejandro Sanz ^a, Juan D. Prieto ⁱ, Isabel García ⁱ, María I. Pacheco ^a, Teresa Garcés ^{a,b}, Casilda Llacer ^{b,j}, Nuria Romero-Laorden ^k, Francisco Zambrana ^l, Pedro P. López-Casas ^a, David Lorente ^{a,m}, Joaquin Mateo ⁿ, Colin C. Pritchard ^o, Emmanuel S. Antonarakis ^p, David Olmos ^{a,b}, Tamara L. Lotan ^{c,**}, Elena Castro ^{a,b,j,*}

^a Prostate Cancer Clinical Research Unit, Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

^b Genitourinary Cancer Translational Research Group, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Spain

^c Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA

^d Medical Oncology, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia

^e Radiation Oncology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^f Urology Department, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

^g Department of Pathology, Hospital de Getafe, Getafe, Spain

^h Bioinformatics Unit, Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain

ⁱ Department of Pathology, Hospital Universitarios Virgen de la Victoria Málaga, Spain

^j Medical Oncology, UGCI, Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional de Málaga, Málaga, Spain

^k Medical Oncology, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

^l Medical Oncology, Hospital Universitario Infanta Sofía, Madrid, Spain

^m Medical Oncology, Hospital Provincial de Castellón, Castellón de la Plana, Spain

ⁿ Prostate Cancer Translational Research Unit, Vall'Hebron Institute of Oncology, Spain

^o University of Washington Medical Center, Seattle, USA

^p Medical Oncology, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA

Received 18 October 2020; received in revised form 29 December 2020; accepted 16 January 2021

Available online 21 February 2021

* Corresponding author: Translational Genitourinary Cancer Research Unit, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Campus de Teatinos, s/n, Málaga, 29010, Spain.

** Corresponding author: Johns Hopkins University 1550 Orleans St, Baltimore, MD, 21231, USA.

E-mail address: tlotan1@jhmi.edu (T.L. Lotan), elena.castro@ibima.eu (E. Castro).

¹ Contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.01.027>

0959-8049/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS

Prostate cancer;
BRCA2;
 Intraductal;
 Cribriform;
 Germline testing

Abstract Background: Intraductal (IDC) and cribriform (CRIB) histologies in prostate cancer have been associated with germline *BRCA2* (*gBRCA2*) mutations in small retrospective series, leading to the recommendation of genetic testing for patients with IDC in the primary tumour.

Patients and methods: To examine the association of *gBRCA2* mutations and other tumour molecular features with IDC and/or cribriform (CRIB) histologies, we conducted a case–control study in which primary prostate tumours from 58 *gBRCA2* carriers were matched (1:2) by Gleason Grade Group and specimen type to 116 non-carriers. Presence/absence of IDC and CRIB morphologies was established by two expert uropathologists blinded to *gBRCA2* status. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) and next-generation sequencing (NGS) were used to detect *BRCA2* alterations, *PTEN* deletions and *TMPRSS2-ERG* fusions. Chi-squared tests were used to compare the frequency of IDC and CRIB in *gBRCA2* carriers and controls and to assess associations with other variables. Logistic regression models were constructed to identify independent factors associated with both histology patterns.

Results: No significant differences between *gBRCA2* carriers and non-carriers were observed in the prevalence of IDC (36% *gBRCA2* versus 50% non-carriers, $p = 0.085$) or CRIB (53% *gBRCA2* versus 43% non-carriers $p = 0.197$) patterns. However, IDC histology was independently associated with bi-allelic *BRCA2* alterations (OR 4.3, 95%CI 1.1–16.2) and *PTEN* homozygous loss (OR 5.2, 95%CI 2.1–13.1). CRIB morphology was also independently associated with bi-allelic *BRCA2* alterations (OR 5.6, 95%CI 1.7–19.3).

Conclusions: While we found no association between *gBRCA2* mutations and IDC or CRIB histologies, bi-allelic *BRCA2* loss in primary prostate tumours was significantly associated with both variant morphologies, independently of other clinical-pathologic factors.

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aberrations in *BRCA2*, either germline or somatic, have been described in about 10% of prostate tumours [1–3]. Both type of alterations predict response to poly ADP(ribose)-polymerase (PARP) inhibitors [2,4] while germline *BRCA2* (*gBRCA2*) mutations have also been associated with poor prostate cancer outcomes [5]. A strong family history of breast, ovarian and/or prostate cancer is the principal feature to suspect a *gBRCA2* mutation; however, such family background is missing in a significant proportion of prostate cancer patients found to carry an inherited mutation in *BRCA2* [6–8]. Identifying *gBRCA2* in prostate cancer patients is not only relevant for managing the disease but also for the prevention and early diagnosis of tumours in relatives who may have inherited the mutation and consequently present an increased cancer risk. Although a universal testing strategy would identify most *BRCA2* carriers, the resources required for such approach make it unfeasible for most healthcare systems at present. Therefore, identifying histologic and clinical characteristics clearly associated with *gBRCA2* mutations would be crucial for the optimization of germline testing algorithms.

Intraductal carcinoma (IDC) has been reported to be more common in prostate tumours associated with germline mutations in *BRCA2* and other DDR genes compared with sporadic prostate cancers [9–11]. IDC

has often been under-reported due to the difficulty of distinguishing IDC from other lesions such as cribriform (CRIB) histology without ancillary immunohistochemistry assays. However, a recent review found IDC to be increasingly prevalent in cohorts with low-risk (2%), intermediate-risk (23%) and high-risk (37%) localised prostate cancer as well as metastatic disease (56%) [12]. IDC and CRIB histology are independent prognostic factors for poor clinical outcomes [13–16] and should be included in routine pathologic assessment of primary prostate cancer [17,18].

Although the evidence available is still limited, the revised clinical guidelines of the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [19] and the Philadelphia Prostate Cancer Consensus Conference [20] already advise genetic testing on all prostate cancer patients with IDC and CRIB histologies in the primary tumour, regardless of tumour stage or family history of cancer. To provide further evidence for (or against) this recommendation, we conducted a prospective case–control study in which two expert uropathologists blinded to *gBRCA2* status reviewed the presence/absence of IDC and/or CRIB variants in 174 primary prostate tumours, one-third of which were from *gBRCA2* carriers and two-thirds of which were from non-carriers. We also explored other clinical and molecular characteristics potentially associated with IDC and CRIB morphology.

2. Methods

2.1. Study design and patients

This is a case–control study that included prostate cancer patients previously screened for *gBRCA2* mutations. ‘Cases’ were patients with known deleterious mutations in *gBRCA2* enrolled in the PROREPAIR-A

study [21]. These cases were matched 1:2 with ‘controls’ by specimen type (prostatectomy versus core-biopsy) and by Gleason Grade Group (\leq Grade Group 3, \geq Grade group 4) identified from the PROREPAIR-B [8] or PROREPAIR-C studies, which included prostate cancer patients with metastatic castration-resistant and localised disease, respectively (Fig. 1). Controls were prostate cancer patients found not to carry any germline

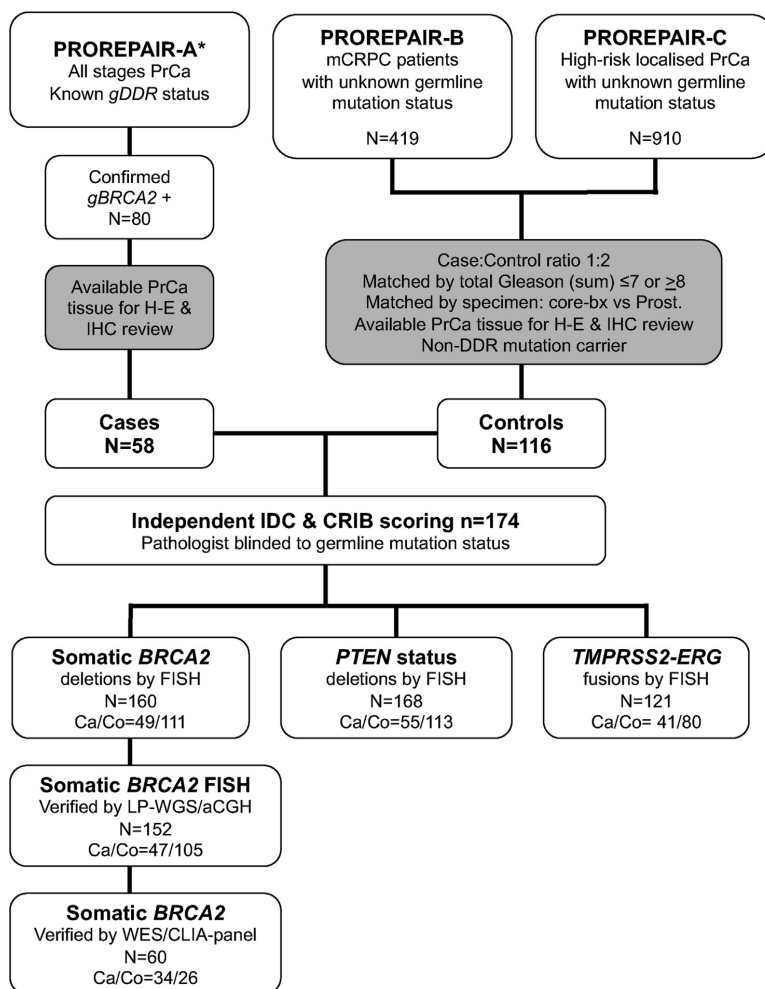


Fig. 1. Case-control study flow diagram. All PROREPAIR studies were initiated simultaneously in January 2013. PROREPAIR-A [21] is an ambispective study that enrolled prostate cancer patients known to carry a germline mutation in *BRCA1*, *BRCA2* or another DDR genes. PROREPAIR-B [8] is a prospective study in which patients with unknown mutational status were enrolled at diagnosis of mCRPC. PROREPAIR-C enrolled men with high-risk localized prostate cancer treated with radical prostatectomy or radiotherapy between January 2009 and December 2014, and followed them prospectively. Abbreviations: PrCa – prostate cancer; mCRPC – metastatic castration-resistant prostate cancer; gDDR – germline mutation in DNA damage repair genes; *gBRCA2+* – germline *BRCA2* mutation carrier; H-E – hematoxylin–eosin staining; IHC – immunohistochemistry; core-bx – FFPE prostatic core biopsy; Prost. – FFPE prostatectomy blocks; IDC – intraductal; CRIB – cribriform; FISH – fluorescent in-situ hybridization; Ca/Co – cases/controls; LP-WGS – low-pass whole genome sequencing; aCGH – array comparative genomic hybridization (aCGH); WES – whole exome sequencing.

mutation in *BRCA2* or in any other DDR genes using a targeted sequencing panel previously described [8]. The current analysis was approved by the regulatory authorities and by institutional review boards at the centers participating in PROREPAIR-A, -B and -C.

Archival diagnostic formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material from biopsies or prostatectomies of primary prostate tumours were centrally reviewed by three different pathologists (AGP, JDP, IG) who marked slides amenable for the molecular and genomic studies detailed below.

2.2. Intraductal and cribriform morphology scoring

Two expert uropathologists not involved in the PROREPAIR studies (DCS and TL) and blinded to patients' *gBRCA2* status, examined hematoxylin and eosin-stained sections from the FFPE blocks used for FISH and/or sequencing studies. They independently scored each case for the presence/absence of IDC and/or CRIB morphologies based on previously published morphological criteria [22]. The percentage of IDC/CRIB was calculated as the estimate of combined IDC/CRIB architecture contained in the total amount of tumour. Immunohistochemistry for basal cell markers was manually performed for histologic confirmation of presence/absence of IDC (either p63 immunostaining, ab735, Abcam, mouse, 1:200 or anti-cytokeratin 14 antibody, clone LL002, Sigma–Aldrich, mouse, 1:1000).

2.3. Molecular characterization of tumour samples

Somatic *BRCA2* alterations, *PTEN* losses and *TMPRSS2-ERG* rearrangements were interrogated by FISH, prioritizing *BRCA2* analyses if tissue was scarce. FISH studies were conducted as previously described [23,24] using directly labeled BAC and/or commercial probes for *BRCA2*, *PTEN* and *TMPRSS2-ERG*. Sections were scanned using an Ariol SL-50 scanner (Leica). Tumour areas were independently scored for *PTEN* loss and *TMPRSS2-ERG* fusions according to previously described criteria [24,25] by two trained investigators (RL, EC). *BRCA2* genomic deletion was defined as the loss of one signal in at least 50% of a minimum of 100 evaluable cells. Loss of both signals was considered biallelic *BRCA2* loss. Tumours from *gBRCA2* carriers with genomic deletion of the second allele were considered to have a bi-allelic *BRCA2* loss, otherwise *gBRCA2* tumours were classified as mono-allelic *BRCA2* loss.

In all but eight samples, the *BRCA2* status determined by FISH was verified by either low-pass whole genome sequencing or array comparative genomic hybridization. In a subset of 60 samples, these results were also confirmed by whole exome sequencing or a CLIA-grade targeted gene panel (FoundationOne or UW-OncoPlex).

2.4. Statistical methods

No formal statistical sample size calculation was conducted. The study sample size was determined by the number of eligible *gBRCA2* tumours that could be matched by the pre-specified criteria in a 1:2 ratio with eligible controls.

Descriptive statistics were used to summarise patient and sample characteristics. The prevalence of IDC and CRIB variants in prostate cancer tumours from cases and controls were compared using chi-squared tests. Other associations between patient/tumour characteristics and *gBRCA2* status, and IDC-CRIB histology variants, were analyzed using the chi-squared test, Mantel–Haenszel linear-trend test, or the Mann–Whitney U test, as appropriate. Multivariable logistic regression analysis (MVA) models were used to assess independent significant associations with IDC and/or CRIB features. These models included the matching variables, those variables associated to IDC, CRIB and *gBRCA2* status and any other variant unbalanced between arms and may act as potential confounding factors. All *P* values were two-sided. Statistical Package for the Social Sciences for Windows version 19 (SPSS, Chicago, IL) was used.

3. Results

A total of 174 primary prostate tumours were reviewed, including 58 from *gBRCA2* mutation carriers (cases) and 116 from non-carriers (controls). Prostatectomies represented 78.0% of the samples analyzed, and 51.7% of tumours were Gleason Grade Group ≥ 4 . *gBRCA2* carriers were slightly younger than non-carriers at diagnosis (61.3 versus 63.9 years, $p = 0.004$). No differences were observed in median PSA levels at diagnosis between the two groups (12.1 versus 9.3 ng/ml, $p = 0.236$). T3-4 tumours were more frequent in *BRCA2* carriers than in non-carriers (31% versus 10.3%, $p < 0.001$). Nodal (12.1% versus 4.3%, $p = 0.057$) and distant metastases (24.1% versus 16.4%) were more often present at diagnosis in *gBRCA2* carriers, but the differences were not statistically significant (Table 1).

3.1. Cases versus controls: Intraductal, cribriform and other molecular characteristics

After independent blinded histopathological review (Fig. 2), our study did not find a significant association between *gBRCA2* mutations and IDC or CRIB features (Table 1). Briefly, IDC features were identified in 36.2% of *gBRCA2* carriers and 50% of non-carriers ($p = 0.085$), while CRIB morphology was present in 53.4% and 43.1% of carriers and non-carriers, respectively ($p = 0.197$). IDC and/or CRIB was observed in 56.6% of carriers and 62.1% of controls ($p = 0.660$).

Table 1
Characteristics of all patients and tumours included in the study.

	gBRCA2 carriers n = 58	Non-carriers N = 116	P value
Age at diagnosis			
Median, years (range)	61.3 (43.9–77.3)	64.0 (44.7–82.7)	p = 0.004
PSA at diagnosis			
Median, ng/mL (range)	9.3 (0.5–3380)	12.1 (1.5–198)	p = 0.236
Gleason Grade Group^a			
1/2/3	28 (48.3%)	56 (48.3%)	p = 1.0
≥4	30 (51.7%)	60 (51.7%)	
Tumour size			
T1	3 (5.2%)	28 (24.1%)	P < 0.001
T2	37 (63.8%)	74 (63.8%)	
T3	16 (27.6%)	12 (10.3%)	
T4	2 (3.4%)	0	
Unknown	0	2 (1.7%)	
Node involvement			
N0	51 (87.9%)	111 (95.7%)	p = 0.057
N1	7 (12.1%)	5 (4.3%)	
Metastases at diagnosis			
M0	44 (75.9%)	97 (83.6%)	p = 0.218
M1	14 (24.1%)	19 (16.4%)	
Specimen^a			
Biopsy	13 (22.4%)	26 (22.4%)	p = 1.0
Prostatectomy	45 (77.6%)	90 (77.6%)	
Intraductal histology (IDC)			
Yes	21 (36.2%)	58 (50%)	
No	37 (63.8%)	58 (50%)	p = 0.085
Cribriform histology (CRIB)			
Yes	31 (53.4%)	50 (43.1%)	
No	27 (46.6%)	66 (56.9%)	p = 0.197
IDC and/or CRIB %			
≥30%	14 (24.1%)	28 (24.1%)	
Median % (range)	10% (0–100)	<10% (0–100)	p = 1.0
BRCA2 alteration in primary tumour			
No	0	91 (78.4%)	p < 0.001
Monoallelic (LOH, gBRCA2)	24 (41.4%)	3 (2.6%)	
Biallelic (LOH+gBRCA2 or bi-allelic del)	25 (43.1%)	17 (14.7%)	
Undetermined	9 (15.5%)	5 (4.3%)	
PTEN status in primary tumour			
PTEN + (normal/heterozygous loss)	32 (55%)	83 (71.6%)	p = 0.046
PTEN – (homozygous loss)	23 (39.6%)	30 (25.9%)	
Undetermined	3 (5.2%)	3 (2.5%)	

Percentage distribution across each variable include unknown or missing patients; however, for statistical hypothesis testing patients with missing or unknown values were excluded.

Abbreviations: gBRCA2 – germline BRCA2 mutation carriers; LOH – loss of heterozygosity; del – deletion.

^a Gleason Grade Group and specimen were matching variables.

When the analysis was limited to cases with ≥30% IDC/CRIB [26], these patterns were identified in 24.1% of both, gBRCA2 and controls (Suppl. Table 1). We explored the value of different percentages of IDC/CRIB as cut-offs to predict gBRCA2. The resulting area under the ROC curve (AUC) was 52.4% (95%CI 43.0%–61.9%) (Suppl. Fig. 1). No correlations were either found between IDC and/or CRIB morphologies and the position and type of germline BRCA2 mutations (Suppl. Table 2).

As expected, somatic BRCA2 alterations, both mono- (49.0% versus 2.7%) and bi-allelic (51.0% versus 15.3%; p < 0.001) were more frequent in gBRCA2 than in controls. In our series, PTEN homozygous loss was also more frequent in gBRCA2 tumours than in controls

(41.8% versus 26.5%, p = 0.046). The prevalence of TMPRSS2-ERG rearrangements did not differ between the two groups (54.9% gBRCA2 versus 52.5%, p = 0.820).

3.2. Characteristics of Intraductal and cribriform tumours

IDC and CRIB histologies were present in 45.4% and 46.6% of all samples, respectively (Table 2), without significant differences by specimen type. IDC features were more frequent in tumours with Gleason Grade Group ≥4 than Grade Groups 1–3 (p = 0.013).

A gBRCA2 mutation was present in 26.6% of tumours with IDC (Table 2) and 32% of those with

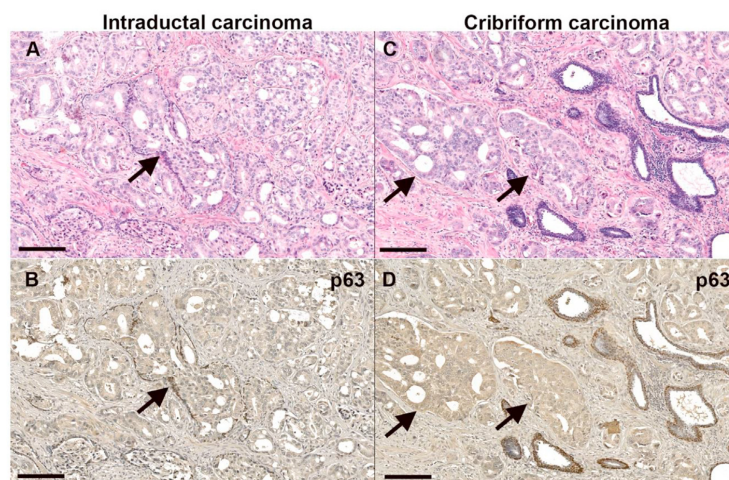


Fig. 2. **IDC and CRIB histology:** Intraductal (IDC) versus cribriform (CRIB) carcinoma. IDC was distinguished from CRIB using immunohistochemical stains for basal cell markers, such as p63. (A) Hematoxylin and eosin image of IDC focus (arrow), which demonstrates basal cells on p63 immunohistochemistry (B). (C) Hematoxylin and eosin-stained image of CRIB (arrow) which lacks basal cells on p63 immunohistochemistry (D). Scale bar represents 200 μm .

IDC and/or CRIB histologies (Suppl. Table 1). Bi-allelic somatic, or somatic plus germline, *BRCA2* alterations were significantly more prevalent in tumours with IDC than without IDC (42.7% versus 11.8%, $p < 0.001$). *PTEN* homozygous loss was present in almost half of cases with IDC features (48.7%) compared with 16.8% of tumours without such histology ($p < 0.001$). Taken together, the univariable Odds Ratio of IDC versus no-IDC was higher in tumours with bi-allelic *BRCA2* alterations (OR 5.1, 95%CI 1.9–13.5), *PTEN* loss (OR 5.1, 95%CI 2.1–12.6) or both (OR 23.0, 95%CI 4.9–107.2), compared with those without any of these alterations. CRIB morphology (Table 2) was significantly more frequent in tumours with Gleason Grade Group ≥ 4 ($p = 0.002$), higher serum PSA at diagnosis ($p = 0.005$) and higher T stage ($p = 0.005$). In addition, bi-allelic *BRCA2* alterations were also associated with higher probability of CRIB histology (45.2% versus 10.3%, $p < 0.001$). Conversely, *PTEN* homozygous loss ($p = 0.265$) or *TMPRSS2-ERG* fusion ($p = 0.696$) were not associated with CRIB features.

MVA models (Table 3) confirmed the independent association of bi-allelic *BRCA2* alterations ($p = 0.031$) and *PTEN* homozygous loss ($p < 0.001$) with IDC histology. *TMPRSS2-ERG* rearrangement was not associated with IDC diagnosis ($p = 0.265$). Gleason Grade Group ≥ 4 , serum PSA value above median, and bi-allelic *BRCA2* alterations were independent factors associated with CRIB histology.

4. Discussion

We have found no association between germline *BRCA2* mutations and IDC or CRIB histologies in our series, as the prevalence of these two morphologies did not differ between *gBRCA2*-related and sporadic tumours. However, bi-allelic *BRCA2* loss (and homozygous *PTEN* loss) in the primary prostate tumours were significantly associated with IDC, independently of other clinical-pathologic factors or *gBRCA2* mutations. Bi-allelic *BRCA2* loss were also independently associated with CRIB morphology.

IDC of the prostate is characterized by a lumen-spanning and frequently expansile proliferation of atypical prostatic epithelium within expanded prostatic ducts and acini, with a full or partially preserved basal cell layer [22] (Fig. 2). These features are frequently seen with an adjacent invasive CRIB component and would be missed without the use of basal cell markers. Several reports on the clinical implications of IDC and or CRIB histologies have not differentiated these two entities [18]. We scored IDC and CRIB morphologies independently, but because in many clinical cases it may not be feasible to distinguish IDC and CRIB, we also analyzed the association of germline and somatic *BRCA2* alterations with the presence of IDC and/or CRIB (Table 3, Suppl. Table 1). As these histology patterns could be missed in biopsy samples, we also repeated the analyses considering only prostatectomy specimens (Suppl. Table 3). None of these entities (IDC, CRIB, IDC and/or CRIB) correlated with *gBRCA2* mutations specifically.

Table 2
Characteristics of tumours with IDC and CRIB morphologies.

	No IDC n = 95	IDC present n = 79	P value	No CRIB n = 93	CRIB present n = 81	P value
Age at diagnosis						
Median, years (range)	63.2 (43.9–82.7)	63.6 (44.7–80.2)	p = 0.987	63.0 (43.9–80.2)	63.7 (44.7–82.7)	p = 0.924
PSA at diagnosis						
Median, ng/mL (range)	11.5 (0.5–561)	11.6 (2.7–3380)	p = 0.562	10.9 (0.5–442)	15.6 (2.7–3380)	p = 0.005
Type of specimen						
Biopsy	24 (25.3%)	15 (19%)	p = 0.323	22 (23.7%)	17 (21%)	p = 0.674
Prostatectomy	71 (74.7%)	64 (81%)		71 (76.3%)	64 (79%)	
Gleason Grade Group						
Grade Group 1	18 (18.9%)	3 (3.8%)		21 (22%)	0	p = 0.002
Grade Group 2/3	37 (38.9%)	26 (32.9%)	p = 0.013	24 (36.6%)	29 (35.8%)	
Grade Group 4/5	40 (42.1%)	50 (63.3%)		38 (40.8%)	52 (64.2%)	
Tumour size						
T1	22 (23.2%)	9 (11.4%)		22 (23.7%)	9 (11.1%)	p = 0.005
T2	57 (60%)	54 (68.3%)	p = 0.265	61 (65.6%)	50 (61.7%)	
T3	14 (14.7%)	14 (17.7%)		9 (9.7%)	19 (23.5%)	
T4	2 (2.1%)	0		1 (1.1%)	1 (1.2%)	
Unknown	0	2 (2.5%)		0	2 (2.4%)	
Node involvement						
N0	90 (94.7%)	72 (91.1%)	p = 0.351	86 (92.5%)	76 (46.9%)	p = 0.725
N1	5 (5.3%)	7 (8.9%)		7 (7.5%)	5 (6.2%)	
Metastases at diagnosis						
M0	80 (84.2%)	61 (77.2%)	p = 0.241	78 (83.9%)	63 (77.8%)	p = 0.306
M1	15 (15.8%)	18 (22.8%)		15 (16.1%)	18 (22.2%)	
Germline <i>BRCA2</i> status						
Non-carrier	58 (61.1%)	58 (73.4%)	p = 0.085	66 (71%)	50 (61.7%)	p = 0.197
Carrier	37 (38.9%)	21 (26.6%)		27 (29%)	31 (38.3%)	
<i>BRCA2</i> alteration in primary tumour						
No	51 (53.7%)	40 (50.6%)	p < 0.001	59 (63.4%)	32 (39.5%)	p < 0.001
Monoallelic (LOH, <i>gBRCA2</i>)	24 (25.3%)	3 (3.8%)		19 (20.4%)	8 (9.9%)	
Biallelic	10 (10.5%)	32 (40.5%)		9 (9.7%)	33 (40.7%)	
(LOH+ <i>gBRCA2</i> , bi-allelicDel)						
Undetermined	10 (10.5%)	4 (5%)		6 (6.4%)	8 (9.9%)	
<i>PTEN</i> status in primary tumour						
<i>PTEN</i> + (normal/heterozygous loss)	76 (80%)	39 (49.4%)	p < 0.001	67 (72%)	48 (59.3%)	p = 0.265
<i>PTEN</i> - (homozygous loss)	16 (16.8%)	37 (46.8%)		26 (28%)	27 (33.3%)	
Undetermined	3 (3.2%)	3 (3.8%)		0	6 (7.4%)	

Percentage distribution across each variable include unknown or missing patients; however, for statistical hypothesis testing patients with missing or unknown values were excluded. Abbreviations: IDC – intraductal; CRIB – cribriform; *gBRCA2* – germline *BRCA2* mutation carriers; LOH – loss of heterozygosity; Del – deletion.

The presence of IDC/CRIB in $\geq 30\%$ of tumour has previously been associated with genomic instability [26], but the use of 30% or any other percentage as cut-off did not allow to predict the presence of a *gBRCA2* mutation (Suppl. Fig. 1).

IDC, CRIB and IDC and/or CRIB were independently associated with bi-allelic *BRCA2* loss, regardless of the origin (somatic or germline) of these alterations. Bi-allelic *BRCA2* loss is often an early event and complete *BRCA2* loss of function might have the potential to affect the tumour morphology. Tumours with a *gBRCA2* pathogenic mutation and the second allele intact may still preserve some degree of *BRCA2* function that could, somehow, prevent IDC and CRIB histologies. A controversial correlation between the location of truncating *gBRCA2* mutations and phenotype has been suggested in breast and ovarian cancers [27], but in

this series we were unable to identify any association between the type and position of the *gBRCA2* mutations and the presence of IDC, CRIB or *BRCA2* genomic deletion. However, it is noteworthy that none of the three tumours carrying the pathogenic missense variant c.8167G>C (p.D2723H) presented IDC, CRIB or *BRCA2* LOH (Suppl. Table 2).

The high prevalence of bi-allelic *BRCA2* alterations described in up to 70% of the primary prostate tumours arising in germline *BRCA2* mutation carriers [28,29] may have acted as a confounding factor in previous studies that reported an association between IDC and *gBRCA2* mutations, as these studies did not consider somatic *BRCA2* events [9,10,30]. Risbridger *et al.* [9] first observed an increased incidence of IDC in patient-derived xenografts from three *gBRCA2* mutation carriers. A subsequent retrospective pathology

Table 3
Multivariable logistic regression analyses for IDC, CRIB and IDC/CRIB histologies.

	IDC MVA analysis OR (95%CI)	P value	CRIB MVA analysis OR (95%CI)	P value	IDC/CRIB MVA analysis OR (95%CI)	P value
gBRCA2 mutation						
Yes versus no	0.4 (0.1–1.9)	p = 0.248	1.2 (0.3–4.7)	p = 0.819	1.6 (0.3–7.8)	p = 0.586
Specimen						
Prostatectomy versus core-biopsy	2.3 (0.9–6.0)	p = 0.099	1.8 (0.7–4.2)	p = 0.194	1.7 (0.7–4.1)	p = 0.226
Gleason Grade Group						
≥4 versus 1–3	1.9 (1.1–4.9)	p = 0.136	2.9 (1.3–6.3)	p = 0.009	2.2 (1.0–4.8)	p = 0.058
Tumour stage:						
T2 versus T1	2.5 (0.9–7.2)	p = 0.091	1.5 (0.6–4.2)	p = 0.403	2 (0.8–5.3)	p = 0.158
T3–4 versus T1	2.3 (0.6–9.2)	p = 0.224	3.1 (0.8–11.4)	p = 0.087	2.9 (0.8–10.7)	p = 0.120
Age at diagnosis						
>65 years versus ≤65 years	0.6 (0.3–1.3)	p = 0.192	0.7 (0.3–1.4)	p = 0.297	0.7 (0.3–1.5)	p = 0.326
Median PSA						
>median versus ≤median	0.739 (0.3–1.9)	p = 0.525	4.1 (1.6–10.5)	p = 0.004	2.5 (1.1–6.0)	p = 0.038
BRCA2 alteration						
Monoallelic versus normal	0.2 (0–1.5)	p = 0.128	0.9 (0.2–4.6)	p = 0.916	0.5 (0.1–2.8)	p = 0.429
Biallelic versus normal	4.3 (1.1–16.2)	p = 0.031	5.6 (1.7–19.3)	p = 0.006	4.6 (1.1–19.6)	p = 0.041
PTEN status						
Homozygous loss (–) versus no (+)	5.2 (2.1–13.1)	p < 0.001	0.8 (0.3–1.8)	p = 0.566	2.4 (1.0–5.8)	p = 0.059

Abbreviations: OR – odds ratio; IDC – intraductal; CRIB – cribriform; gBRCA2 – germline BRCA2 mutation carriers; LOH – loss of heterozygosity; Del – deletion.

review identified IDC in 42% of 33 primary prostate tumours from gBRCA2 carriers compared with 9% of 32 sporadic tumours [9]. In a univariate analysis, gBRCA2 patients with IDC histology in the primary tumour had shorter overall survival compared with carriers without IDC [9]. Genomic analyses of 14 primary tumours from gBRCA2 carriers revealed different genomic and epigenomic profiles in the 8 cases with IDC histology [30], including MED12L/MED12 amplifications. These genomic alterations have been associated with prostate cancer aggressiveness and progression [30] and could underpin the observation that IDC impacts negatively on the outcomes of patients with gBRCA2 mutations. However, this hypothesis has not been validated as none of the larger studies addressing the role of germline BRCA2 mutations in prostate cancer have taken into consideration histological subtypes [5].

The clinical significance of IDC and CRIB has been acknowledged in recent years as several reports have identified both pathological features as strong independent predictors for disease recurrence and mortality [13,14,17]. Frequently observed copy number alterations in tumours with IDC and CRIB features include amplification of 8q24 and chromosomal deletions of 8p, 6q and 13q [16,26], the latter containing the genomic locus of BRCA2. PTEN loss has also been associated with IDC features [31], whilst mutations in ATM and SPOP have been reported as frequent events in tumours with CRIB histology [16]. Mutations in DDR genes other than BRCA2 have also been linked to IDC features in prostate cancer. In a series of 150 prostate cancer patients that included 21 germline DDR carriers (9 BRCA2, 3 ATM, 3 CHEK2, 2 BRCA1, 1 CDH1, 1

MSH6, 1 NBN, 1 PALB2), half of the germline DDR carriers (48%) presented with IDC or ductal histologies, compared with 12% of sporadic tumours (p < 0.003) [10]. In a second report, 3 out of 13 (23%) mismatch repair (MMR)-deficient prostate tumours presented with ductal or IDC histologies, compared with 14 out of 114 (12%) MMR-proficient tumours [11]. Validation of these findings in larger studies may be advisable to support the recommendation of germline testing for all patients with IDC histology regardless of family history of cancer or tumour stage.

Although our case–control study is strengthened by the blinded IDC and CRIB pathologic scoring, we must also acknowledge several limitations. First, the study design allowed us to establish the prevalence of IDC and CRIB in gBRCA2 tumours, but the true prevalence of gBRCA2 mutations in IDC or CRIB histologies cannot be accurately determined. Second, we determined PTEN status by FISH and the prevalence of PTEN loss in our series may be lower than reported with the use of an IHC assay [32]. Finally, somatic BRCA2 mutations potentially causing loss of BRCA2 function were not analyzed in two-thirds of the tumours. Therefore, the number of tumours with somatic BRCA2 alterations in our series is likely to be higher, particularly for gBRCA2 tumours, and the association of IDC and CRIB histologies with bi-allelic BRCA2 alterations should be considered exploratory.

5. Conclusions

In our series, we found no association between gBRCA2 mutations and IDC or CRIB histologies. However, bi-allelic BRCA2 loss and PTEN homozygous loss in

primary prostate tumours correlated with IDC, an association that was strengthened when both events occur in the same tumour. Our results do not support the recommendation of germline *BRCA2* testing for all prostate cancer patients with IDC/CRIB histologies but may serve as a foundation for further studies analyzing the value of IDC/CRIB as markers of bi-allelic *BRCA2* (and perhaps other bi-allelic DDR gene) loss in the primary tumour.

Author contributions section

RL, EA, DO, TL and EC conceived and designed the study.

RL, DCS, SS, IMA, HT, FLC, JRB, CLL, NRL, FZ, PLC, DL, JM, CCP, DO, TLL and EC acquired the tissue samples and clinical data.

AGP, JDP and IG marked slides amenable for the molecular and genomic studies.

DCS and TLL scored samples for the presence of IDC and CRIB patters.

IMA, MIP, TG, TD, AS, JM and CCP prepared the samples and interpreted sequencing data.

RL, FLC and EC conducted and interpreted FISH results.

RL and DO performed the statistical analyses.

RL, TL, EA, DO and EC wrote the manuscript in consultation with JM and CCP. All authors provided critical feedback and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest statement

R.L. declares speaker fees from Roche, Janssen, Sanofi and Bayer, and travel support from Roche, Janssen, Sanofi and Astellas Pharma.

S.S. declares honoraria from Amgen, Bristol-Meyers Squibb, Merck, Merck Serono consulting or Advisory Role from AstraZeneca and Merck, research funding from AstraZeneca, Merck Sharp and Dohme, Amgen and Endocyte.

F.L.-C. declares consulting or Advisory Role from Astella Pharma, speaker fees from Janssen, Astellas Pharma, Research Funding from Astellas Pharma (Inst) and travel support from Astellas Pharma and Janssen.

J.R.-B. declares consulting or Advisory Role from Janssen, Astellas Pharma and Bayer, and Research Funding from HealthMDx (Inst).

J.R.B. declares consulting or advisory role from Astellas Pharma, Bayer and Janssen-Cilag and research funding from MDxHealth (Inst).

C.L. declares honoraria from Roche and travel support from Astellas Pharma and Angelini. N.R.-L. declares speaker fees from MSD, consulting or Advisory Role from Ipsen, Astellas Pharma, Bayer, Tesaro,

AstraZeneca and Sanofi, research funding from Janssen (Inst), and Pfizer (Inst) and travel support from Janssen.

F.Z. declares expert testimony for Sanofi and travel support from Ipsen.

D.L. declares speaker fees from Janssen, Bayer, Astellas Pharma, Sanofi, Pfizer and BMS, consulting or Advisory Role from Sanofi, and travel support from Janssen, and Astellas Pharma.

J.M. declares consulting or advisory role from AstraZeneca, Janssen and Roche, speaker's bureau from Astellas Pharma, AstraZeneca and Sanofi and travel support from AstraZeneca, Ipsen and Sanofi.

C.C.P. declares consulting or Advisory Role from AstraZeneca and Promega.

E.S.A. declares honoraria and consulting or advisory role from Astellas, AstraZeneca, Clovis Oncology, Dendreon, ESSA, Janssen Biotech, Medivation, Merck, Sanofi; Research Funding from Aragon Pharmaceuticals (Inst), Astellas (Inst), AstraZeneca (Inst), Clovis Oncology (Inst), Constellation Pharmaceuticals (Inst), Dendreon (Inst), Exelixis (Inst), Genentech (Inst), Janssen Biotech (Inst), Johnson&Johnson (Inst), Merck (Inst), Millennium (Inst), Novartis (Inst), Sanofi (Inst) and Tokai pharmaceuticals (Inst); co-inventor of a biomarker technology licensed to Qiagen.

D.O. declares honoraria from Bayer, Janssen and Sanofi, consulting or Advisory Role from AstraZeneca, Bayer, Clovis, Daiichi-Sankyo, Janssen, MSD and Roche, research funding from Astellas (Inst), AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst), Genentech (Inst), Janssen (Inst), Medivation (Inst), MSD (Inst), Pfizer (Inst), F. Hoffman-Roche (Inst) and Tokai Pharmaceuticals (Inst) and travel support from Bayer, Ipsen, Janssen and Roche.

T.L. declares consulting or advisory role for Janssen and research funding from DeepBio and Ventana Medical Systems.

E.C. declares honoraria from Astellas Pharma, AstraZeneca, Bayer, Clovis, Janssen, Pfizer and Roche, consulting or Advisory Roles for AstraZeneca, Bayer, Janssen, MSD and Pfizer, research funding from AstraZeneca (Inst), Bayer (Inst) and Janssen (Inst) and travel support from AstraZeneca, Bayer and Janssen.

D.C.S., I.M.A., H.T., A.M.G.-P., L.M., T.D., A.S., J.D.P., I.G., M.I.P., T.G. and P.P.-L. do not have any relationships to disclose.

Acknowledgments

This study was supported by grants from 'Instituto de Salud Carlos III' (PI19/01475 to EC; PI13/01287, PI16/01565 and PI19/01380 to DO), 'Fundación Científica de la AECC' research grant (PROYE19054OLMO to DO) and an unrestricted grant from 'Fundación CRIS contra el Cáncer'. Data used in this study were also generated as part of a Department of Defense awards W81XWH-18-1-0756

(PC170510) and W81XWH-18-1-0356 (PC170503P2) to CCP, W81XWH-18-1-0758(PC170510P1) to JM, and W81XWH-18-1-0770 (PC170510P2) to DO.

'Instituto de Salud Carlos III' supported RL (CM17-00221), NRL (JR17/00007), CL (CM19/00234) and EC (JR18/00011) and 'Ministerio de Ciencia e Innovación' provided funding to IMA (FJCI-2016-28121), DO (RYC-2015-18625) and EC (JCI-2014-19129). The Prostate Cancer Foundation Young Investigator Award program has supported CC, JM, ESA, DO, TL and EC. CCP ESA is partially supported by NIH grant R01CA185297, DOD grant W81XWH-16-PCR-CCRSA, the Prostate Cancer Foundation, and the Patrick C. Walsh research fund.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.01.027>.

References

- [1] Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015;161:1215–28.
- [2] Hussain M, Mateo J, Fizazi K, et al. Survival with olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2020;383:2345–57.
- [3] Abida W, Armenia J, Gopalan A, 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. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00029>.
- [4] Abida W, Patnaik A, Campbell D, et al. Rucaparib in men with metastatic castration-resistant prostate cancer harboring a BRCA1 or BRCA2 gene alteration. *J Clin Oncol* 2020;38(32):3763–72.
- [5] Nombela P, Lozano R, Aytes A, et al. BRCA2 and other DDR genes in prostate cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11.
- [6] Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2016;375:443–53.
- [7] Nicolosi P, Ledet E, Yang S, et al. Prevalence of germline variants in prostate cancer and implications for current genetic testing guidelines. *JAMA Oncol* 2019;5(4):523–8.
- [8] Castro E, Romero-Laorden N, Del Pozo A, 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;37:490–503.
- [9] Risbridger GP, Taylor RA, Clouston D, 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* 2015;67:496–503.
- [10] Isaacsson Velho P, Silberstein JL, Markowski MC, et al. Intraductal/ductal histology and lymphovascular invasion are associated with germline DNA-repair gene mutations in prostate cancer. *Prostate* 2018;78:401–7.
- [11] Antonarakis ES, Shaikat F, Isaacsson Velho P, et al. Clinical features and therapeutic outcomes in men with advanced prostate cancer and DNA mismatch repair gene mutations. *Eur Urol* 2019;75:378–82.
- [12] Porter LH, Lawrence MG, Ilic D, et al. Systematic review links the prevalence of intraductal carcinoma of the prostate to prostate cancer risk categories. *Eur Urol* 2017;72:492–5.
- [13] Kweldam CF, Wildhagen MF, Steyerberg EW, et al. Cribriform growth is highly predictive for postoperative metastasis and disease-specific death in Gleason score 7 prostate cancer. *Mod Pathol* 2015;28:457–64.
- [14] Kweldam CF, Kummerlin IP, Nieboer D, et al. Disease-specific survival of patients with invasive cribriform and intraductal prostate cancer at diagnostic biopsy. *Mod Pathol* 2016;29:630–6.
- [15] Chua MLK, Lo W, Pintilie M, et al. A prostate cancer "Nimbus": genomic instability and SchLAP1 dysregulation underpin aggression of intraductal and cribriform subpathologies. *Eur Urol* 2017;72:665–74.
- [16] Elfandy H, Armenia J, Pederzoli F, et al. Genetic and epigenetic determinants of aggressiveness in cribriform carcinoma of the prostate. *Mol Canc Res* 2019;17:446–56.
- [17] Samaratunga H, Delahunt B, Egevad L, et al. Intraductal carcinoma of the prostate is an aggressive form of invasive carcinoma and should be graded. *Pathology* 2020;52:192–6.
- [18] van Leenders G, Kweldam CF, Hollemans E, et al. Improved prostate cancer biopsy grading by incorporation of invasive cribriform and intraductal carcinoma in the 2014 Grade groups. *Eur Urol* 2020;77:191–8.
- [19] NCCN. NCCN: prostate cancer. 2020., Version 2.2020.
- [20] Giri VN, Knudsen KE, Kelly WK, et al. Role of genetic testing for inherited prostate cancer risk. In: Philadelphia prostate cancer consensus conference 2017, vol. 36; 2018. p. 414–24.
- [21] Lozano R, Castro E, Aragon I, et al. Clinical and molecular characterization study of prostate cancer (PC) patients with and without previously known germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol* 2020;38(Suppl): abstr 5511).
- [22] Guo CC, Epstein JI. Intraductal carcinoma of the prostate on needle biopsy: histologic features and clinical significance. *Mod Pathol* 2006;19:1528–35.
- [23] Lambros MB, Simpson PT, Jones C, 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;86:398–408.
- [24] Attard G, Clark J, Ambroisine L, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:253–63.
- [25] Reid AH, Attard G, Brewer D, et al. Novel, gross chromosomal alterations involving PTEN cooperate with allelic loss in prostate cancer. *Mod Pathol* 2012;25:902–10.
- [26] Bottcher R, Kweldam CF, Livingstone J, et al. Cribriform and intraductal prostate cancer are associated with increased genomic instability and distinct genomic alterations. *BMC Canc* 2018;18(8).
- [27] Gayther SA, Mangion J, Russell P, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* 1997;15:103–5.
- [28] Jonsson P, Bandlamudi C, Cheng ML, et al. Tumour lineage shapes BRCA-mediated phenotypes. *Nature* 2019;571:576–9.
- [29] Castro E, Jugurnauth-Little S, Karlsson Q, et al. High burden of copy number alterations and c-MYC amplification in prostate cancer from BRCA2 germline mutation carriers. *Ann Oncol* 2015;26:2293–300.
- [30] Taylor RA, Fraser M, Livingstone J, et al. Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nat Commun* 2017;8:13671.
- [31] Lotan TL, Gumuskaya B, Rahimi H, et al. Cytoplasmic PTEN protein loss distinguishes intraductal carcinoma of the prostate from high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2013;26:587–603.
- [32] Lotan TL, Wei W, Ludkovski O, et al. Analytic validation of a clinical-grade PTEN immunohistochemistry assay in prostate cancer by comparison with PTEN FISH. *Mod Pathol* 2016;29:904–14.

3.1. Resumen en castellano

“Association between BRCA2 alterations and intraductal and cribriform histologies in prostate cancer”

Introducción, objetivos y metodología: La identificación de pacientes portadores de mutaciones germinales en *BRCA2* (*gBRCA2*) es relevante no solamente para el manejo terapéutico, sino también para la prevención y el diagnóstico precoz de tumores en familiares que puedan heredar la mutación y, en consecuencia, presentar mayor riesgo de desarrollar cáncer. Por ello, es necesario identificar características histológicas o clínicas asociadas a *gBRCA2* para optimizar los algoritmos de análisis en línea germinal.

Los patrones histológicos intraductal (IDC) y cribriforme (CRIB) se han asociado con la presencia de *gBRCA2* en series retrospectivas de pocos pacientes, lo cual ha llevado a la recomendación de realizar análisis genético germinal en todos los pacientes con patrón IDC. Por ello, y para ampliar la evidencia al respecto, se ha llevado a cabo un estudio prospectivo de casos y controles en el cual se incluyeron pacientes previamente testados para mutaciones germinales en *BRCA2*. Los “casos” fueron pacientes con presencia de mutaciones germinales en *BRCA2* incluidos en el estudio PROREPAIR-A. Los casos fueron emparejados en una proporción 2:1 con “controles” (no portadores) en base al grupo de Gleason (\leq Gleason grupo 3 vs \geq Gleason grupo 4) y el tipo de tejido tumoral (prostatectomía vs biopsia). Los controles procedían de los estudios PROREPAIR-B y PROREPAIR-C, en los cuales se incluyeron pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico y cáncer de próstata localizado, respectivamente. Los controles debían ser pacientes sin alteraciones germinales en *BRCA2* u otros genes relacionados con la reparación del ADN.

El objetivo principal fue analizar la asociación entre *gBRCA2* y la presencia de patrones histológicos de IDC y/o CRIB. La presencia de estos dos patrones fue evaluada por dos patólogos expertos “ciegos” para los “casos” y los “controles”. Se llevaron a cabo análisis mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescent in-situ hybridization*) y secuenciación de nueva generación (NGS, *next-generation sequencing*) para analizar alteraciones somáticas en *BRCA2*, pérdidas de *PTEN* o fusiones de *TMPRSS2-ERG*.

Resultados: Se incluyeron un total de 174 pacientes, incluyendo 58 *gBRCA2* (casos) y 116 no portadores (controles). No se encontraron diferencias significativas entre pacientes *gBRCA2* y no portadores en relación con la presencia de patrones IDC (36% *gBRCA2* vs 50% no portadores; $p=0,085$) o CRIB (53% *gBRCA2* vs 43% no portadores; $p=0,197$). Sin embargo, las alteraciones bialélicas somáticas, o la presencia de alteración somática y germinal en *BRCA2* fueron más prevalentes en tumores con patrón IDC frente a tumores sin este patrón (42,7% versus 11,8%, $p<0,001$). La pérdida homocigota de *PTEN* estaba presente en casi la mitad de los tumores con patrón IDC en comparación con tumores sin esta histología (48,7% vs 16,8%; $p<0,001$). Las alteraciones bialélicas en *BRCA2* fueron más frecuentes en patrones CRIB frente a no CRIB (45,2% versus 10,3%; $p<0,001$). Sin embargo, la diferencia en cuanto a la pérdida homocigota de *PTEN* no fue estadísticamente significativa en relación con el patrón CRIB ($p=0,265$). En el análisis multivariable, la histología IDC se asoció de forma independiente con alteraciones bialélicas en *BRCA2* (OR 4,3; IC95% 1,1-16,2) y la pérdida homocigota de *PTEN* (OR 5,2; IC95% 2,1-13,1). El patrón CRIB se asoció de forma independiente con alteraciones bialélicas en *BRCA2* (OR 5,6; IC95% 1,7-19,3).

Conclusiones: En el presente estudio no se han encontrado asociaciones entre mutaciones germinales en *BRCA2* y la presencia de patrones IDC o CRIB. Sin embargo, la presencia de alteraciones bialélicas en *BRCA2* está asociada a ambos patrones histológicos de forma independiente.