

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**VNiVERSIDAD**  
**DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

**“CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR DEL  
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y SUS ISOFORMAS EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA  
METASTÁSICO *DE NOVO*”**

PAMELA VÁZQUEZ CÁRDENAS

2021





EL DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, EL DR. D. JUAN LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA Y EL DR. D. FRANCISCO ANTONIO GÓMEZ VEIGA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado “Caracterización clínico-molecular del receptor de andrógenos y sus isoformas en pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo*”, que presenta la graduada en Químico Farmacéutico Biólogo Dña. Pamela Vázquez Cárdenas ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca a 3 de marzo de 2021.

Fdo.: Dr. Rogelio González Sarmiento

**El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto AECCSal16/002.**





## AGRADECIMIENTOS

Hace poco más de cuatro años empezó este sueño y esta aventura, quiero agradecer especialmente al **Dr. Rogelio** que sin conocerme me dio la oportunidad de trabajar a su lado, siempre le estaré eternamente agradecida por ayudarme a cumplir este sueño. Por su esfuerzo y dedicación, por toda su ayuda, sus consejos y sobre todo por su paciencia, gracias por aceptarme en tu brillante equipo de investigación. Muchas gracias por todo Rogelio.

Al **Dr. Juan Luis García**, gracias por apoyarme siempre, por esa disponibilidad, por toda su ayuda en el laboratorio y contagiarme de esa alegría aún en los momentos más difíciles. Después de tanto, ahora si habrá que festejar con ese mezcal.

Al **Dr. Francisco Veiga**, gracias por aceptar ser parte de este gran proyecto, gracias por tus consejos, tus conocimientos, disponibilidad y tiempo.

Quiero agradecer especialmente a todos los pacientes que de forma altruista colaboran con la investigación. A mis amigos y a todos los chicos que sin conocerme donaron su granito de arena en este proyecto, muchas gracias a todos. De igual manera agradezco al **Servicio de Anatomía Patológica** y al **Servicio de Urología** del Hospital Clínico Universitario de Salamanca por su disposición y su colaboración en todo momento. También agradezco a todas las personas de los diversos laboratorios del **Centro de Investigación del Cáncer** que me brindaron su ayuda durante este tiempo.

Gracias infinitas a todos mis **compañeros de laboratorio**, a los que están y a todos los que he conocido durante esta maravillosa experiencia. Gracias por ayudarme tanto, por todo su apoyo incondicional, por esas risas, por esas aventuras juntos, por todos sus consejos y sobre todo por su amistad. Para mí no sólo son mis amigos, son mi familia... mi familia Salamantina. Los quiero al alma y los voy a extrañar muchísimo, pero, este no es un adiós es un hasta luego y estoy segura de que tendremos más historias juntos.

## AGRADECIMIENTOS

Sin duda ha sido toda una montaña rusa de emociones, dejar mi hogar, mi familia y mis amigos para empezar una nueva vida desde cero, no ha sido nada fácil. Todo lo nuevo asusta, pero, me di cuenta de que aún en la distancia las verdaderas amistades se fortalecen, gracias a todos mis amigos por apoyarme siempre, los quiero mucho.

Y por supuesto a mi **familia**, no sé como agradecerles tanto, gracias por creer en mí, gracias por toda su ayuda y por todo su cariño. **Mamita** eres el pilar de mi vida, gracias por iluminarme en mi camino, gracias por tu apoyo incondicional y gracias por enseñarme a perseguir mis sueños. A **mi hermano**, no se que haría sin ti pequeño saltamontes, gracias por apoyarme siempre en mis locuras y por acompañarme en este sueño desde que empezó. Gracias infinitas por toda tu ayuda y en especial en esta tesis. A **mi abuelita**, gracias por todos tus consejos y por todo tu amor, gracias por darme esos ánimos y toda esa alegría siempre. Los extrañé cada día, pero, aún en la distancia me dieron esa fuerza para seguir, este triunfo es para ustedes.

**Amore mio**, grazie per avermi illuminato come il sole e avermi accompagnato nel mio cammino, so che non è stato facile, ma ti ringrazio con tutto il mio cuoricino. Grazie per la nostra piccola famiglia italiana, ti amo.

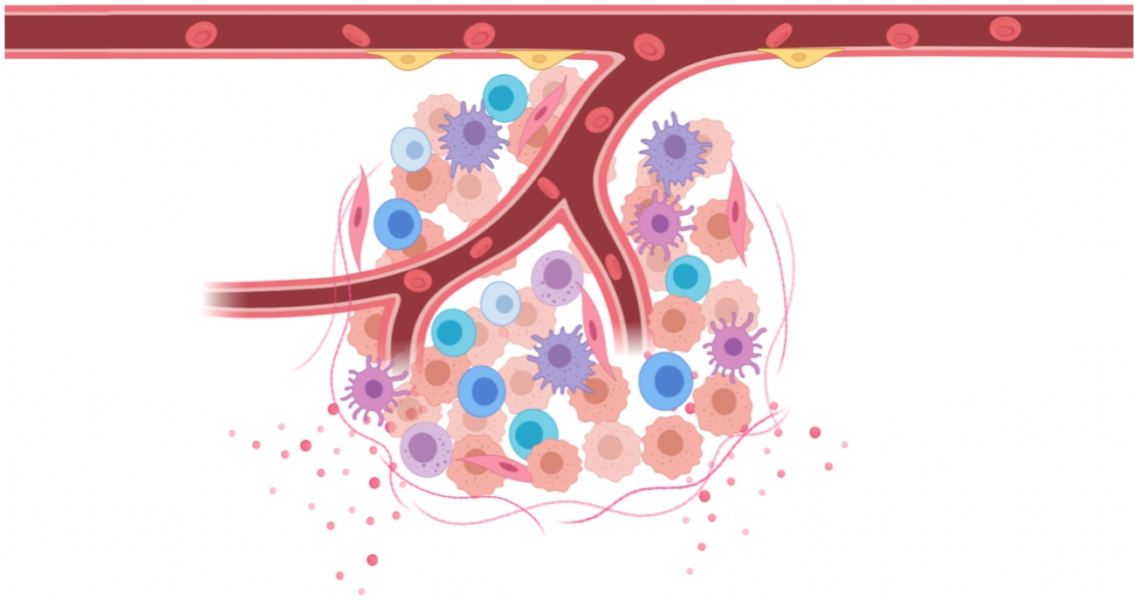
**Con todo mi amor para todas las personas que son importantes en mi vida y que mis logros los toman como suyos, especialmente para Nidia, Ricardo, Amalia y Alessandro.**

“La prosa habitual del ADN incluía fragmentos de pura poesía, cuyos versos lucían una rima perfecta, hermosa, a los ojos de un aficionado a la biología molecular”

**Francis Mojica**



# Índice





# ÍNDICE

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>1 CÁNCER DE PRÓSTATA .....</b>	<b>16</b>
1.1 <i>Aspectos generales del cáncer.....</i>	<i>16</i>
1.2 <i>La glándula prostática.....</i>	<i>17</i>
1.3 <i>Regulación hormonal de la próstata .....</i>	<i>21</i>
1.4 <i>Enfermedades asociadas a la Próstata.....</i>	<i>23</i>
1.5 <i>El cáncer de próstata: aspectos generales .....</i>	<i>25</i>
1.6 <i>Metástasis en el cáncer de próstata.....</i>	<i>28</i>
1.7 <i>Clasificación del cáncer de próstata .....</i>	<i>30</i>
1.8 <i>Etiología del cáncer de próstata.....</i>	<i>35</i>
1.9 <i>Diagnostico del cáncer de próstata .....</i>	<i>36</i>
<b>2 BIOPSIA LÍQUIDA .....</b>	<b>38</b>
2.1 <i>Plaquetas “educadas” por tumores.....</i>	<i>39</i>
2.1.1 <i>Plaquetas “educadas” por tumores (TEPs) en cáncer .....</i>	<i>41</i>
2.2 <i>RNA circular.....</i>	<i>43</i>
2.2.1 <i>Mecanismos de regulación de los circRNA.....</i>	<i>45</i>
2.2.2 <i>Implicación de los circRNA en cáncer.....</i>	<i>47</i>
2.2.3 <i>Importancia clínica de los circRNA en cáncer.....</i>	<i>48</i>
<b>3 EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR).....</b>	<b>48</b>
3.1 <i>Estructura del AR.....</i>	<i>50</i>
3.2 <i>Mecanismos de acción del AR .....</i>	<i>51</i>
3.3 <i>Importancia del AR en cáncer de próstata .....</i>	<i>54</i>
3.4 <i>Mecanismos moleculares implicados en la activación del AR .....</i>	<i>55</i>
3.5 <i>Las variantes del AR.....</i>	<i>56</i>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>70</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
1. <b>PACIENTES.....</b>	<b>68</b>
2. <b>MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
2.1 <i>Cultivos celulares.....</i>	<i>70</i>
2.2 <i>Obtención de células mononucleadas y plasma.....</i>	<i>71</i>
2.3 <i>Aislamiento de plaquetas .....</i>	<i>72</i>
3. <b>ESTUDIOS CON RNA.....</b>	<b>72</b>
3.1 <i>Aislamiento de RNA a partir de células mononucleares.....</i>	<i>72</i>
3.2 <i>Aislamiento de RNA a partir de líneas celulares.....</i>	<i>73</i>
3.3 <i>Aislamiento de RNA a partir de plaquetas.....</i>	<i>73</i>
3.4 <i>Cuantificación del RNA .....</i>	<i>74</i>
3.5 <i>Purificación de RNA .....</i>	<i>74</i>
3.6 <i>RT-PCR .....</i>	<i>74</i>
3.7 <i>PCR cuantitativa-comparativa a tiempo real (qPCR).....</i>	<i>75</i>
3.8 <i>Estudio de la expresión de las variantes de AR en células mononucleares.....</i>	<i>77</i>
3.9 <i>Estudio de la expresión de AR y sus variantes en plaquetas circulantes .....</i>	<i>78</i>
4. <b>ESTUDIO DEL CIRCAR EN SANGRE PERIFÉRICA.....</b>	<b>80</b>
4.1 <i>Obtención de RNA circular a partir de plasma y líneas celulares .....</i>	<i>80</i>
4.1.1 <i>Extracción de RNA Total en plasma.....</i>	<i>81</i>
4.1.2 <i>Extracción de RNA total a partir de líneas celulares .....</i>	<i>81</i>
4.2 <i>Degradación de RNA lineal.....</i>	<i>82</i>
4.3 <i>Extracción de RNA circular en plasma .....</i>	<i>82</i>
4.4 <i>Extracción de RNA circular a partir de líneas celulares.....</i>	<i>82</i>
4.5 <i>Estudio de la expresión del AR circular .....</i>	<i>82</i>
4.6 <i>Electroforesis en gel de agarosa.....</i>	<i>84</i>



4.7	<i>Purificación de DNA por Columna</i> .....	84
4.8	<i>Secuenciación</i> .....	85
5.	ESTUDIO GENÓMICO EN TEJIDO TUMORAL .....	85
5.1	<i>Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado</i> .....	85
5.2	<i>Cuantificación de DNA</i> .....	86
5.3	<i>Estudio citogenético en muestras tumorales mediante MIP array con la plataforma OncoScan™</i> .....	87
5.4	<i>Análisis de genes implicados en la vía de andrógenos por NGS</i> .....	90
5.4.1	<i>Diseño del panel</i> .....	90
5.5	<i>Preparación de la muestra</i> .....	92
5.6	<i>Amplificación de la librería ligada por adaptadores (Dual Index)</i> .....	94
5.7	<i>Hibridación</i> .....	94
5.8	<i>Amplificación de la librería de captura</i> .....	96
5.9	<i>Purificación de la librería</i> .....	96
5.10	<i>Secuenciación en el equipo MiSeq (Illumina)</i> .....	96
6.	ESTUDIOS CON PROTEÍNAS .....	98
6.1	<i>Extracción de proteínas a partir de líneas celulares</i> .....	98
6.2	<i>Extracción de proteínas en plasma</i> .....	98
6.3	<i>Electroforesis capilar con inmunoensayo</i> .....	99
<b>RESULTADOS</b> .....		<b>103</b>
1.	ESTUDIO DEL GEN <i>AR</i> Y SUS VARIANTES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CAP METASTÁSICO DE <i>NOVO</i> .....	105
1.1	<i>Estudio de la expresión de AR y sus variantes en células mononucleares de sangre periférica por qPCR</i> .....	105
2.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>AR</i> Y SUS VARIANTES EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA METASTÁSICO DE <i>NOVO</i> .....	106
2.1	<i>Detección de proteínas de AR mediante la técnica de Simple West</i> .....	106
2.2	<i>Detección de proteínas de ARv7 mediante la técnica de Simple West</i> .....	108
2.3	<i>Estudio de circRNA derivados del gen AR</i> .....	111
3.	ESTUDIO DEL GEN <i>AR</i> Y SUS VARIANTES EN PLAQUETAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA METASTÁSICO DE <i>NOVO</i> .....	114
3.1	<i>Estudio de la expresión del gen ITGA2B</i> .....	116
3.2	<i>Estudio del transcrito AR-FL</i> .....	117
3.3	<i>Estudio del transcrito ARv7</i> .....	119
3.4	<i>Estudio del transcrito ARv567</i> .....	120
3.5	<i>Correlación de las características clínico-patológicas en relación con la supervivencia global y la expresión de las variantes ARv7-ARv567</i> .....	122
3.6	<i>Correlación de niveles de expresión de circAR y AR-FL en plaquetas circulantes</i> .....	125
4.	ESTUDIO GENÓMICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN TEJIDO TUMORAL .....	127
4.1	<i>Análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de cáncer de próstata</i> .....	127
4.2	<i>Estudio de los genes implicados en la vía de señalización del AR mediante secuenciación masiva (NGS)</i> .....	133
<b>DISCUSIÓN</b> .....		<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>172</b>
<b>ANEXOS</b> .....		<b>176</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		<b>175</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

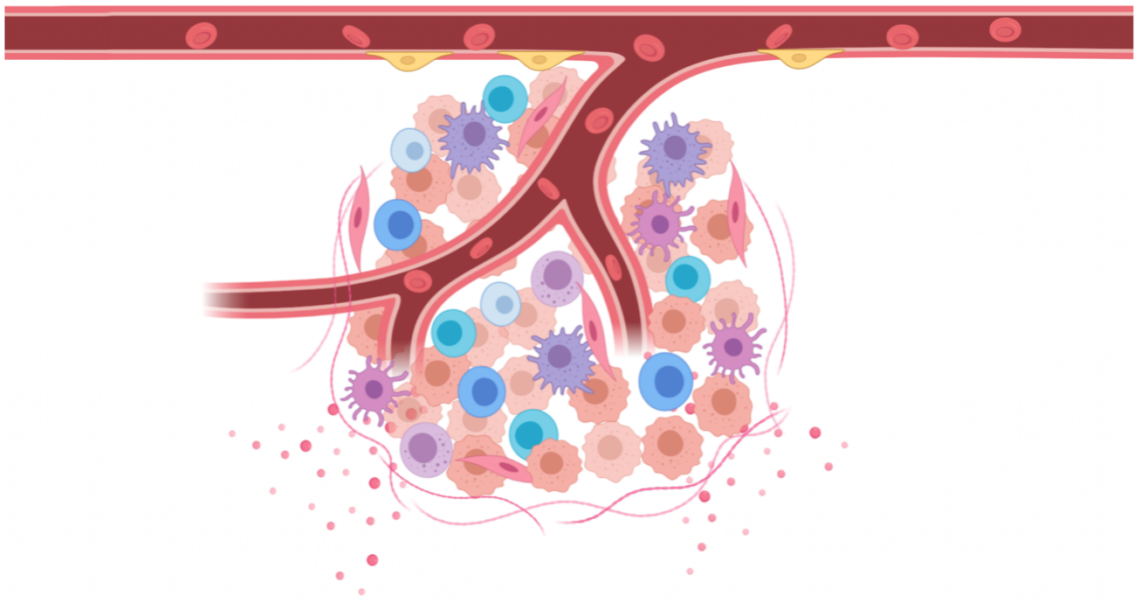
<b>Figura 1.</b> Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo.	17
<b>Figura 2.</b> Esquema anatómico de la glándula prostática.	18
<b>Figura 3.</b> Esquema de las distintas zonas de la próstata.	19
<b>Figura 4.</b> Tipos de células diferenciadas en la próstata.	20
<b>Figura 5.</b> Síntesis de las hormonas esteroideas que actúan sobre la próstata.	22
<b>Figura 6.</b> Modelo de progresión del cáncer de próstata.	27
<b>Figura 7.</b> Representación anatomopatológica del estadio Gleason.	32
<b>Figura 8.</b> Fuentes de biopsia líquida.	39
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la educación de plaquetas mediada por tumores.	42
<b>Figura 10.</b> Empalme de circRNA y diversidad de isoformas.	44
<b>Figura 11.</b> La regulación de los circRNA en el cáncer.	46
<b>Figura 12.</b> Regulación de circRNAs en cáncer.	47
<b>Figura 13.</b> Estructura del receptor de andrógenos.	51
<b>Figura 14.</b> Integración de la señalización no genómica y la señalización genómica del receptor de andrógenos.	53
<b>Figura 15.</b> Variantes de empalme clínicamente relevantes.	57
<b>Figura 16.</b> Esquema General de Trabajo empleado en este estudio.	70
<b>Figura 17.</b> Representación del gradiente de densidad en sangre periférica por el método de ficoll.	72
<b>Figura 18.</b> Gráfica de la curva de fusión del producto de amplificación	76
<b>Figura 19.</b> Esquema representativo de los pasos a seguir para el aislamiento de RNA circular.	80
<b>Figura 20.</b> Ejemplificación de la selección del RNA circular para AR y el diseño de los primers divergentes.	83
<b>Figura 21.</b> Imagen representativa del DIN en diferentes muestras de DNA.	87
<b>Figura 22.</b> Ensayo MIP.	88
<b>Figura 23.</b> Amplificación de librerías de enriquecimiento por captura.	91
<b>Figura 24.</b> El diagrama de electroforesis muestra el tamaño del pico entre 200 y 250 pb.	92
<b>Figura 25.</b> Representación del proceso de hibridación en placa.	95
<b>Figura 26.</b> Representación de una placa empleada para el inmunoensayo.	100
<b>Figura 27.</b> Representación gráfica de la amplificación de AR y sus variantes en pacientes a partir de células mononucleares.	105
<b>Figura 28.</b> Representación de la detección de AR.	107
<b>Figura 29.</b> Representación de la detección de ARv7.	108
<b>Figura 30.</b> Supervivencia global según la presencia o ausencia de AR y ARv7 en el plasma de pacientes con CaP.	110
<b>Figura 31.</b> Supervivencia global según la presencia o ausencia de AR+/ARv7+ y AR+/ARv7- en el plasma de pacientes con CaP.	110
<b>Figura 32.</b> Amplificación y validación de circAR.	111
<b>Figura 33.</b> Comparación de medianas e intervalos entre grupos de expresión de circAR en pacientes con CaP y DS.	112
<b>Figura 34.</b> Curva de supervivencia global en relación con los niveles de expresión de circAR.	113
<b>Figura 35.</b> Expresión relativa de los genes analizados en pacientes y donador sano.	115
<b>Figura 36.</b> Curva de SG en relación con los niveles de expresión del gen ITGA2B.	117
<b>Figura 37.</b> Curva de supervivencia global en relación con la expresión del gen AR.	118
<b>Figura 38.</b> Curva de supervivencia global en relación con la expresión del ARv7.	120
<b>Figura 39.</b> Curva de supervivencia global en relación con la expresión de la variante ARv567.	121
<b>Figura 40.</b> Curva de supervivencia global en relación con la expresión de las AR-V.	123
<b>Figura 41.</b> Ideograma representativo de los tumores de CaP.	132

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación TNM del cáncer de próstata.	<b>31</b>
<b>Tabla 2.</b> Sistema Gleason modificado de la ISUP.	<b>34</b>
<b>Tabla 3.</b> Factores de riesgo, clasificación de D'Amico.	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Resumen de las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.	<b>68</b>
<b>Tabla 5.</b> Características de los tumores estudiados por microarrays genómicos.	<b>69</b>
<b>Tabla 6.</b> Características de las líneas celulares de cáncer de próstata.	<b>71</b>
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la RT-PCR.	<b>75</b>
<b>Tabla 8.</b> Primers utilizados para la amplificación de las variantes del receptor de andrógenos.	<b>77</b>
<b>Tabla 9.</b> Representación del programa de amplificación de los genes incluidos en el estudio.	<b>78</b>
<b>Tabla 10.</b> Primers utilizados para la amplificación de las variantes del receptor de andrógenos.	<b>79</b>
<b>Tabla 11.</b> Primers utilizados para la amplificación de los genes analizados mediante qPCR.	<b>83</b>
<b>Tabla 12.</b> Representación del programa de amplificación del AR circular.	<b>84</b>
<b>Tabla 13.</b> Programa del termociclador.	<b>93</b>
<b>Tabla 14.</b> Programa de PCR para el dual index.	<b>94</b>
<b>Tabla 15.</b> Programa de PCR para la amplificación de la librería.	<b>96</b>
<b>Tabla 16.</b> Anticuerpos utilizados en este trabajo.	<b>99</b>
<b>Tabla 17.</b> Características de los pacientes que expresan ARv567.	<b>106</b>
<b>Tabla 18.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con la detección de AR en plasma de pacientes.	<b>108</b>
<b>Tabla 19.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con la detección de ARv7 en plasma de pacientes.	<b>109</b>
<b>Tabla 20.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con la expresión de circAR.	<b>113</b>
<b>Tabla 21.</b> Comparación de los niveles de expresión de mRNA en los diferentes genes de estudio en pacientes con cáncer de próstata metastásico de novo.	<b>114</b>
<b>Tabla 22.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de ITGA2B.	<b>116</b>
<b>Tabla 23.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de AR.	<b>118</b>
<b>Tabla 24.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de la variante ARv7.	<b>119</b>
<b>Tabla 25.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de ARv567.	<b>121</b>
<b>Tabla 26.</b> Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de ARv7+/ARv567+ y ARv7-/Arv567-.	<b>122</b>
<b>Tabla 27.</b> Asociación de niveles de expresión en plaquetas circulantes en pacientes con cáncer de próstata metastásico de novo.	<b>124</b>
<b>Tabla 28.</b> Asociación de los parámetros clínicos con los niveles de expresión de AR y sus variantes y la presencia de sus proteínas.	<b>125</b>
<b>Tabla 29.</b> Asociación de los niveles de expresión de circAR y AR en plaquetas.	<b>126</b>
<b>Tabla 30.</b> Correlación de los niveles de expresión de circAR y AR en plaquetas circulantes en pacientes con cáncer de próstata metastásico de novo.	<b>127</b>
<b>Tabla 31.</b> Comparación de la ganancia y pérdida de segmentos entre pacientes jóvenes y adultos.	<b>128</b>
<b>Tabla 32.</b> Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en el conjunto de tumores con cáncer de próstata.	<b>129</b>
<b>Tabla 33.</b> Incidencia de las regiones focales en pacientes jóvenes y adultos con CaP.	<b>130</b>
<b>Tabla 34.</b> Regiones con LOH y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en los tumores de los pacientes con cáncer de próstata.	<b>131</b>
<b>Tabla 35.</b> Regiones con LOH alterados con mayor frecuencia en tumores con CaP.	<b>131</b>
<b>Tabla 36.</b> Listado de variantes identificadas en los distintos genes implicados en la vía de AR.	<b>134</b>
<b>Tabla 37.</b> Resumen de las variantes encontradas en las diferentes muestras de tejido tumoral.	<b>134</b>



# Abreviaturas





**A**

---

$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ : receptor de vitronectina de tipo integrina  
AA: Acetato de abiraterona  
ADP: Adenosine diphosphate  
ADT: Terapia de privación de andrógenos  
AF-1: Función de la activación transcripcional 1  
AIS: síndrome de insensibilidad a los andrógenos  
AR: Receptor de andrógenos  
ARE: Elementos de respuesta a andrógenos  
AR-FL: AR de longitud completa  
AR-V: Variantes de AR  
ARv7: Variante 7 del receptor de andrógenos  
ARv567: Variante 567 del receptor de andrógenos

**B**

---

BFGF: *basic fibroblast growth factor*  
BMP: Proteínas morfogénicas ósea  
BRAF: B-raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

**C**

---

CaP: Cáncer de próstata  
CCR: Cáncer colorrectal  
CCRCC: Carcinoma de células renales de células claras  
Cdk: Quinasas dependientes de ciclinas  
cDNA: DNA complementario  
CEL: datos de intensidad de fluorescencia  
CHC: Carcinoma hepatocelular  
CIAA: Cloroformo: alcohol isoamílico  
ciRNAs: circRNAs intrónicos  
circHIAT1: circular del transcrito abundante del hipocampus 1  
circPRKCI: circular de la proteína quinasa C de tipo iota  
circRNA: RNA circular  
CNAs: Alteraciones en el número de copias  
CNIA: Nanoimmunoensayo Capilar Automatizado  
CNV: Variaciones en el número de copias  
CP1: proteinasa de cisteína 1  
CP2: proteinasa de cisteína 2  
CRPC: Cáncer de próstata resistente a la castración  
CSCs: Células madre tumorales  
CSIC: Centro de investigación del cáncer  
CTC: Células tumorales circulantes  
ctDNA: DNA tumoral circulante  
CUL4: cullin-4  
CRYAB: B alfa cristalina

**D**

---

DDB1: proteína de unión al DNA dañado 1  
DDB2: proteína de unión al DNA dañado 2  
ddH<sub>2</sub>O: Agua bidestilada estéril

ddPCR: *droplet digital PCR*  
DBD: Dominio de unión al DNA  
DHT: Dihidrotestosterona  
DIN: Número de Integridad del DNA  
DLC1: gen deletado en cáncer de hígado 1  
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DRE: Examen rectal digital  
DS: Donador sano

## E

---

E: Enzalutamida  
ecircRNAs: circRNAs exónicos  
ECM: Célula-matriz extracelular  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
EGF: Factor de crecimiento epidermal  
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal  
ElciRNAs: circRNAs exónicos-intrónicos  
EMT: Transición epitelio mesénquima  
EphA6: receptor 6 de efrina tipo A  
Ephs: receptores de efrina  
ER $\alpha$ : Receptor de estrógenos  $\alpha$   
ER $\beta$ : Receptor de estrógenos  $\beta$   
ET-1: Endotelina 1

## F

---

FBS: Suero fetal bovino  
FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded  
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos  
FSH: Hormona estimulante de folículos  
FUS: Proteína de unión a RNA FUS

## G

---

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GC: Glucocorticoides  
gDNA: DNA genómico  
GLOBOCAN: Global Cancer Observatory  
GR: Receptor de Glucocorticoides

## H

---

HBP: Hiperplasia prostática benigna  
HCG: Gonadotropina coriónica humana  
HK2: Hexocinasa 2  
hnRNP: complejo de ribonucleasa nuclear no homogéneo  
HPA: Hipotálamo-pituitaria-adrenal  
HSPs: Proteínas de choque térmico



**I**

---

IGF: Factor de crecimiento insulínico  
IL-6: Interleucina 6  
IRESs: Sitios de entrada ribosomal internos  
ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica  
ITGA2B: Integrina alfa-IIb  
ITGA8: integrina alfa 8

**K**

---

KLK2: Calicreína 2

**L**

---

LBD: Dominio de unión a ligando  
LH: Hormona luteinizante  
LHRH: Hormona liberadora de hormona luteinizante  
lnRNA: RNA largo no codificante  
LOH: Pérdida de heterocigosidad

**M**

---

MACROD2: mono-ADP ribosilhidrolasa 2  
MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
MED1: proteína mediadora de la transcripción de la subunidad 1 de la RNA polimerasa  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
MITF: Factor de transcripción asociado a microftalmia  
MIP: Molecular Inversion Probe  
MR: Mineralocorticoides  
mCRPC: cáncer de próstata resistente a la castración metastásico  
mRNA: RNA mensajero  
miRNA: microRNA  
MSMB: microseminoproteína-beta  
MSR1: Receptor 1 del captador de macrófagos  
m6A: N6-metiladenosina

**N**

---

NEPC: cáncer de próstata neuroendocrino  
NGS: *Next Generation Sequencing*  
NK: Natural killer  
NKX3.1: proteína homeobox Nkx-3.1  
NR3C1: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1  
NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas  
NTD: Dominio amino terminal  
N33: candidato supresor de tumores 3

**O**

---

OMS: Organización Mundial de la Salud  
ORF: Marco de lectura abierto

**P**

---

PAP: Fosfatasa ácida prostática  
PBMC: células mononucleares de sangre periférica  
PBS: Buffer fosfato salino  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PI: fosfatidil-inositol  
PIA: Atrofia Proliferativa Inflamatoria  
PIN: Neoplasia intraepitelial prostática  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa  
PR: Receptor de progesterona  
PRP: Plasma Rico en Plaquetas  
PSA: Antígeno prostático específico  
PTEN: Phosphatase and tensin homolog

**R**

---

RBP: Proteínas de unión a RNA  
REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer  
RIN: Número de integridad del RNA  
RNA: Ácido ribonucleico  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
RT: Retrotranscripción  
RT-qPCR: Quantitative reverse transcription PCR

**S**

---

SDS: Dodecilsulfato sódico  
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica  
SG: Supervivencial Global  
SHBG: Globulina de unión a las hormonas sexuales  
SLE: Supervivencia libre de enfermedad  
SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*  
SP: Sangre periférica  
SRD5A1: 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 1  
SRD5A2: 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 2  
Stat5: Transductor de señales y activador de la transcripción 5

**T**

---

T: Testosterona  
TAU: Unidades de transactivación  
TEPs: Plaquetas educadas por tumores  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
TMPRSS2: Proteasa transmembrana de tipo 2  
TNM: Tumor, ganglio, metástasis  
TP53: *Tumor Protein 53*  
tRNA: RNA de transferencia  
TSG: Genes supresores de tumores

**U**

---

UBE2C: enzima conjugadora de ubiquitina E2-C  
UICC: Unión Internacional contra el cáncer

**V**

---

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

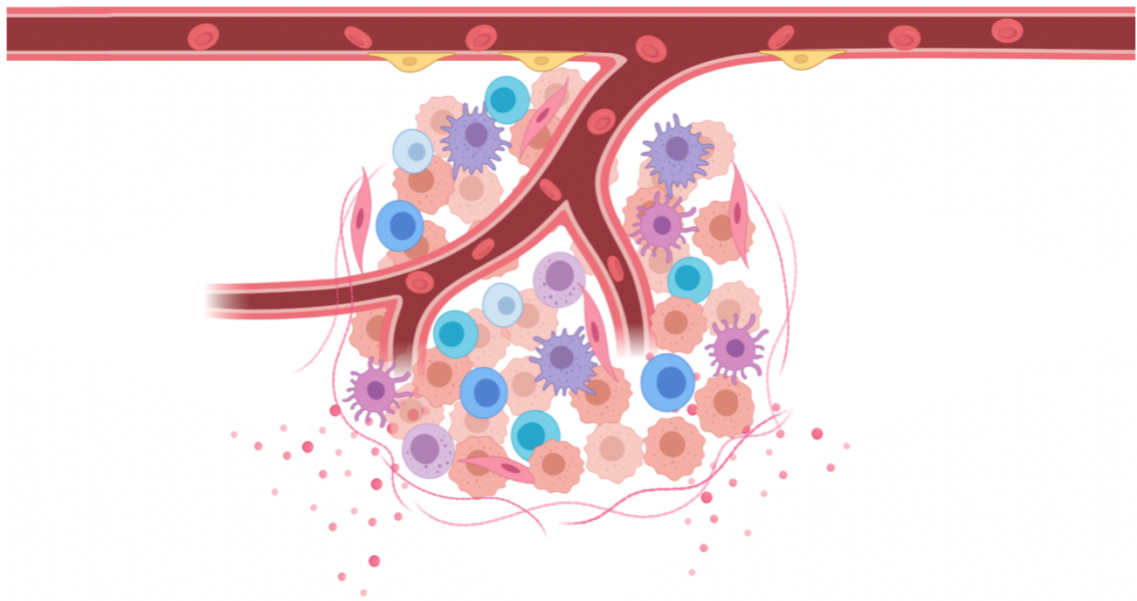
**Z**

---

ZA: Zona anterior  
ZC: Zona central  
ZP: Zona periférica  
ZT: Zona de transición



# Introducción





# 1 Cáncer de Próstata

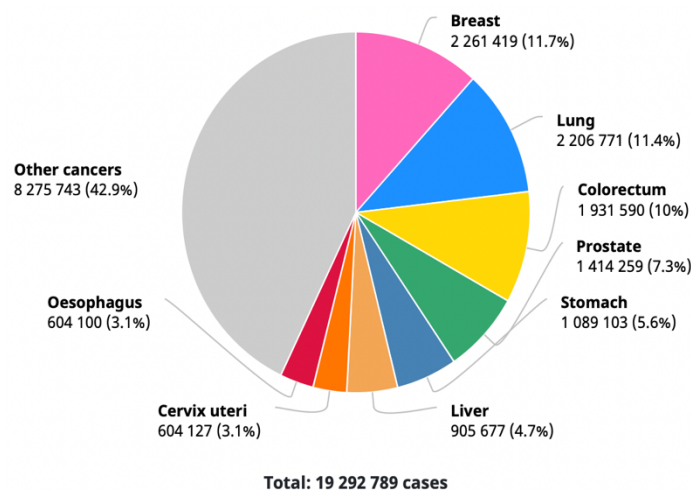
## 1.1 Aspectos generales del cáncer

El término cáncer engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por una división descontrolada de células cuya consecuencia es la proliferación anormal de las mismas, dando lugar a un tumor (Seyfried & Huysentruyt, 2013). Estas células cancerígenas, además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos para diseminarse y proliferar a otras partes del organismo a través de la sangre o el sistema linfático, dando lugar a nuevos tumores (Lazebnik, 2010).

Según los últimos datos publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo, con aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos en el año 2020 (últimos datos disponibles a nivel mundial dentro del proyecto de GLOBOCAN).

El número de cánceres diagnosticados en España en el año 2021 se estima que alcanzará los 276,239 casos según los cálculos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), de los que 158,867 se espera sean en hombres y 117,372 en mujeres. Las estimaciones por GLOBOCAN 2020, indican que el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia (11,7%), seguido por el cáncer de pulmón (11,4%), colorrectal (10%) y el cáncer de próstata (CaP) (7,3%). Si bien el CaP es el tumor más frecuente del varón siendo la segunda o tercera causa de muerte entre países (**Figura 1**).

En España los cánceres más frecuentemente diagnosticados en 2021 serán los de colorrectal (43,581 nuevos casos), próstata (35,764), mama (33,375), pulmón (29,549) y vejiga urinaria (20,613).



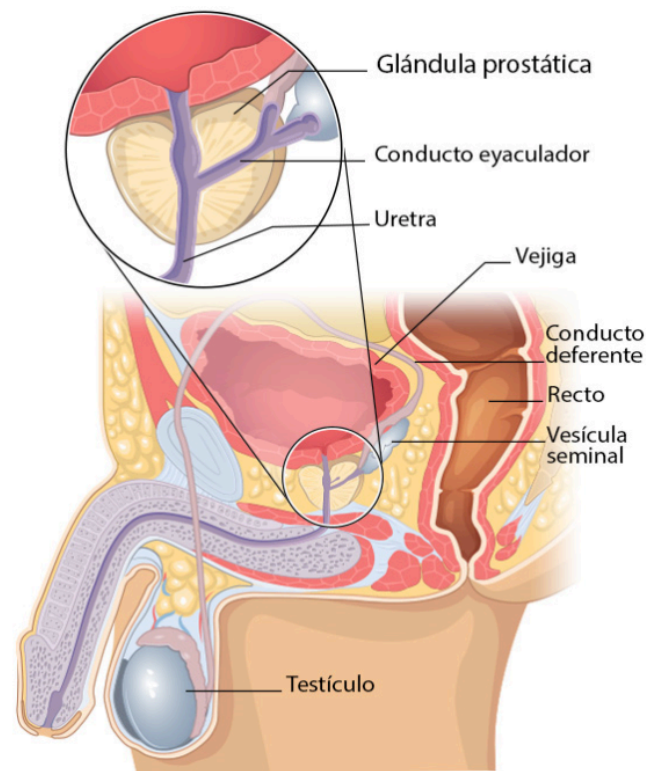
**Figura 1.** Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para el año 2020, ambos sexos (*Global Cancer Observatory*, n.d.).

## 1.2 La glándula prostática

La próstata es la principal glándula del aparato genitourinario masculino, tiene forma de pirámide invertida y se encuentra frente al recto, por debajo de la vejiga, recubriendo la primera parte de la uretra (**Figura 2**). Su función principal es secretar la mayor parte del líquido seminal, cuyos componentes brindan nutrientes y protección a los espermatozoides. Su crecimiento y la formación de las secreciones prostáticas están controlados por hormonas esteroideas y factores de crecimiento producidos local y sistémicamente (Balk et al., 2003). Si bien el rol específico del fluido prostático en el semen aún se desconoce, se cree que su función principal está relacionada con la coagulación, la movilidad espermática y la licuefacción del semen (Verze et al., 2016).

Las secreciones prostáticas son levemente alcalinas, están compuestas principalmente por azúcares y su contenido proteico es menor al 1%. Entre ellas se encuentran la fosfatasa ácida prostática (PAP), el antígeno prostático específico (PSA) y la  $\beta$ -microseminoproteína ( $\beta$ -MSP). El PSA pertenece a la familia de las calicreínas, es sintetizado en la próstata y su producción depende tanto de la presencia de andrógenos como del tamaño de la glándula. La función del PSA es escindir las proteínas seminogelina I y II permitiendo la licuefacción del semen (Balk et al., 2003).





**Figura 2.** Esquema anatómico de la glándula prostática.

En los hombres sanos, una pequeña parte del PSA pasa a la circulación sanguínea, por lo que un aumento de su concentración en la sangre se utiliza como indicador de un crecimiento anormal o inflamación de la glándula prostática, siendo considerado actualmente como un marcador importante para la detección precoz de CaP (Stamey et al., 1987).

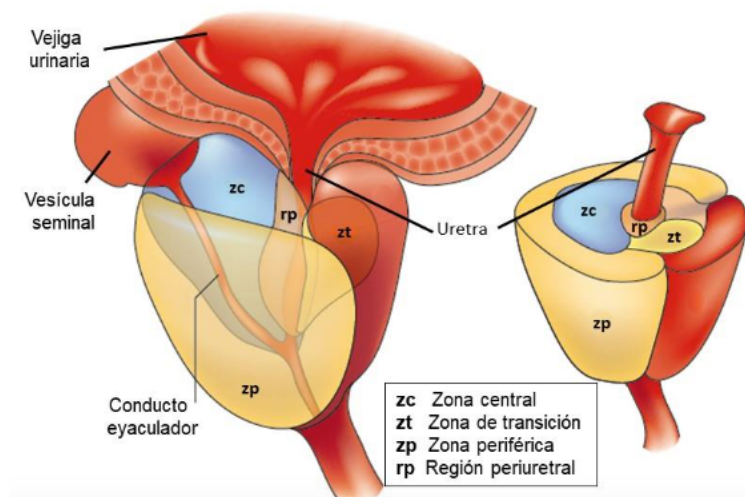
La próstata es un órgano complejo y heterogéneo que presenta componentes diferentes desde el punto de vista patológico, morfológico y funcional. Como se muestra en la **Figura 3** y según el desarrollo de McNeal se divide en cuatro zonas (McNeal, 1981):

**Zona central (ZC)**, constituye el 20-25% del volumen del tejido glandular prostático y es atravesada por los conductos eyaculadores. En esta región se localizan aproximadamente el 10% de las neoplasias malignas.

**Zona de transición (ZT)** y periuretral, representan el 5-10% del volumen de la próstata; es la zona donde se desarrolla la hiperplasia benigna de próstata (HPB) por la acción androgénica y el 10-20% de los tumores malignos de la próstata.

**Zona periférica (ZP)**, corresponde al 70% de la próstata glandular, es la zona donde se localizan alrededor del 80% de los carcinomas, siendo además la más afectada por la prostatitis crónica (De Marzo et al., 2007).

**Zona anterior o estroma fibromuscular (ZA)**, ocupa un tercio de la masa total prostática. Está constituida por tejido no glandular y no se asocia habitualmente con enfermedades de la próstata (Selman, 2011).



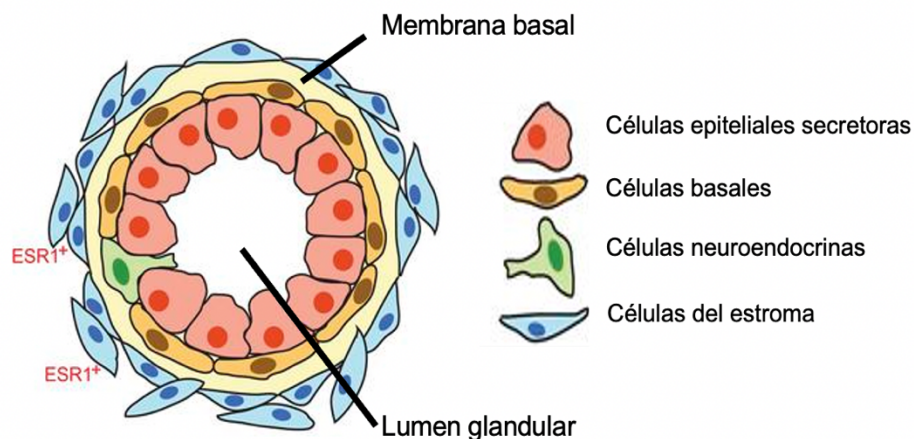
**Figura 3.** Esquema de las distintas zonas de la próstata. Adaptación (De Marzo et al., 2007).

Histológicamente, la glándula prostática está formada por el estroma (células musculares lisas, colágeno, fibroblastos, vasos, nervios y células inmunes) y el epitelio glandular (glándulas ramificadas y conductos), delimitados por la cápsula prostática. En el epitelio prostático normal se pueden diferenciar tres tipos de células: secretoras luminales, basales y neuroendocrinas (**Figura 4**) (Lang et al., 2009).

Las *células epiteliales secretoras (luminales)*, de aspecto cilíndrico, secretan glicoproteínas ubicadas en la región luminal, como el PSA (Sinha et al., 1987) y la fosfatasa ácida prostática, que sirven como marcadores tumorales. Expresan altos niveles del receptor de andrógenos (AR) y tienen alta dependencia por la testosterona para su supervivencia (Kyprianou & Isaacs, 1988).

Las *células basales* están poco diferenciadas. Estas células se caracterizan por no ser secretoras y expresar niveles bajos de AR, por lo que son independientes de los andrógenos para su supervivencia (Man et al., 2006).

Las *células neuroendocrinas*, son de origen neural y presentan prolongaciones de tipo dendritas que conectan con células vecinas. Permiten a la próstata segregar sustancias como la serotonina y una gran variedad de neuropéptidos: somatotatina, cromogranina A, gonadotropina coriónica humana (HCG). Carecen de receptores de andrógenos y en el CaP agresivo se produce una hiperproliferación de esta capa de células.



**Figura 4.** Tipos de células diferenciadas en la próstata. Esquema de los tipos de células en la próstata adulta. El compartimento epitelial está compuesto de células basales que recubren la membrana basal, las células luminales secretoras (epiteliales secretoras) y las células neuroendocrinas. Estos conductos epiteliales son adyacentes a un compartimento estromal que incluye células musculares lisas, fibroblastos y componentes vasculares. Adaptación (Middleton et al., 2019).

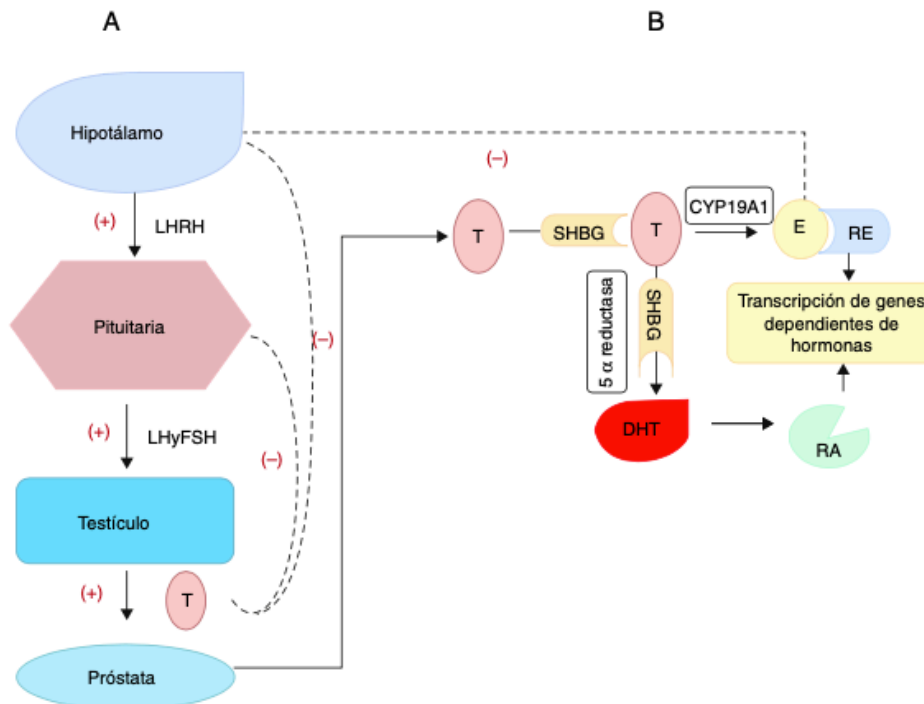
### 1.3 Regulación hormonal de la próstata

El desarrollo y las funciones de la próstata son dependientes de los andrógenos. Los andrógenos son los principales esteroides sexuales en el hombre y son los responsables del desarrollo fenotípico masculino. Del 90 al 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig del testículo siendo los más importantes la testosterona (T), la dihidrotestosterona (DHT) y la androstenediona (Taplin & Ho, 2001). De éstas tres hormonas la testosterona se sintetiza en mayor concentración, por lo que es considerada como el principal andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona presente en el plasma de hombres sanos.

Tanto el crecimiento de la próstata como el mantenimiento de su epitelio secretor están regulados por andrógenos y por su receptor. La síntesis de los andrógenos se regula en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (**Figura 5**). En el hipotálamo se libera la hormona luteinizante (LH), que viaja a través del sistema circulatorio hasta llegar a los testículos donde se estimula la acción de las células Leydig que secretan testosterona a nivel circulatorio.

Posteriormente, la testosterona se unirá a la albúmina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales para llegar hasta la próstata y ejercer sus efectos (Heemers & Tindall, 2007; So et al., 2003). Tanto la fracción libre como la fracción unida de la testosterona se difunden a través de las membranas y entran en la célula prostática, donde la enzima 5- $\alpha$ -reductasa biotransforma la testosterona en su metabolito más activo, DHT, que es transportada por difusión al citoplasma de la célula epitelial, siendo el principal andrógeno mediador del crecimiento prostático (Bartsch et al., 2000).

La unión de DHT al AR de las células glandulares prostáticas, induce la traslocación del receptor al núcleo de la célula.



**Figura 5.** Síntesis de las hormonas esteroideas que actúan sobre la próstata. **A)** Representa la regulación de la síntesis y liberación de la testosterona, a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Las líneas continuas representan la activación (+) y promoción de la liberación de las hormonas. Las líneas discontinuas representan una retroalimentación negativa, dada por la liberación de la T cuyos niveles inhiben negativamente la liberación de la LHRH, de la hormona luteinizante y la estimulante de folículos (FSH). **B)** Se representa la síntesis prostática de la DHT gracias a la acción de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa. Una porción de la T y de la DHT se unen en el plasma a la globulina de unión a las hormonas sexuales (SHBG). La DHT se une al AR y esta unión hormona-receptor se transloca al núcleo para unirse a los elementos de respuesta en el DNA para ejercer su acción (García-Figueroa et al., 2015).

La testosterona y la DHT se unen a un receptor AR y activan genes dependientes de andrógenos. En algunos órganos diana, entre ellos la próstata, la testosterona se convierte en DHT por acción de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa. La familia de la enzima esteroidea 5- $\alpha$ -reductasa (SRD5A) en humanos incluye cinco miembros, SRD5A1-3 y otras menos caracterizadas como la glicoproteína sináptica 2 (GSPN2) y de tipo GSPN2 (Azzouni et al., 2012). Las proteínas SRD5A se expresan de manera diferente en el cuerpo humano para desempeñar diversos roles funcionales.

Se ha visto que la enzima 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 (SRD5A1) está implicada en el metabolismo de los neuroesteroides (Compagnone & Mellon, 2000) y predomina en tejidos extraprostáticos como piel y el hígado, aunque también está presente en la próstata. La enzima 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es la isoforma predominante en la próstata y está codificada por el gen *SRD5A2* localizado en 2p23. Mutaciones identificadas en el gen *SRD5A2* pueden resultar en niveles insuficientes de DHT, lo que lleva a un trastorno autosómico recesivo denominado deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa, que se asocia con genitales subdesarrollados y atípicos.

Por otro lado, la sobreproducción de DHT mediada por la enzima SRD5A2 se asocia con la HPB, alopecia androgénica y cáncer de próstata debido a la señalización excesiva del AR (Xiao et al., 2020; Robitaille & Langlois, 2020).

#### **1.4 Enfermedades asociadas a la Próstata**

Las enfermedades de la próstata pueden ser causadas por diferentes factores etiológicos y dan lugar a dificultades al momento de orinar, como por ejemplo una alta frecuencia de micción, sorpresiva y urgente necesidad de orinar, entre otros síntomas. Entre las enfermedades más frecuentes se encuentran:

##### **Prostatitis**

La prostatitis es la inflamación de la próstata, aparece entre un 10% y un 15% en los hombres. Este síndrome benigno, común en los hombres, se divide en dos tipos: bacteriana y no bacteriana. El patrón de inflamación más característico es el de un infiltrado linfocítico a nivel del estroma. La prostatitis no bacteriana o síndrome del dolor pélvico crónico es la más común de las prostatitis, de etiología desconocida y puede ser inflamatoria (con presencia de leucocitos en las secreciones prostáticas) y no inflamatoria (Krieger et al., 2008). La prostatitis bacteriana a su vez puede ser clasificada en aguda o crónica, la infección aguda de la próstata es causada en su gran mayoría por microorganismos gram-negativos, enterobacterias, que provienen del tracto urinario inferior o de la vía linfática de la zona rectal.

En la prostatitis crónica el proceso inflamatorio e infeccioso recurrente de la vía urinaria inferior es producido por una bacteria gram-negativa *enterobacteriaceae*, que se localiza en la glándula prostática. Esta inflamación crónica provoca daños en el estroma y en las células epiteliales (De Marzo et al., 2007), así como cambios en la estructura y función de las proteínas, alteraciones genéticas y modificaciones en el DNA (Olinski et al., 2002), que pueden inducir a un tumor prostático. Un 27% de los pacientes que deben someterse a biopsias prostáticas debido a un alto nivel de PSA muestran evidencias de prostatitis (Harik & O'Toole, 2012).

A pesar de que no hay datos concluyentes, estudios epidemiológicos realizados en pacientes con prostatitis crónica se han asociado con un aumento del PSA (Stancik et al., 2004), mientras que otros han sugerido que una historia de prostatitis puede estar relacionada con la HPB (Begley et al., 2008) o incluso con el CaP (Wong et al., 2009).

### **Hiperplasia benigna de próstata**

La hiperplasia benigna de próstata se caracteriza por la proliferación no maligna de las células epiteliales y estromales en la zona de transición que rodea la uretra. Se cree que su etiología es multifactorial involucrando tanto factores ambientales como genéticos. Se han descrito diferentes factores implicados en la etiología del crecimiento de la glándula prostática: la edad avanzada, la acción paracrina o autocrina de los factores de crecimiento modulada por hormonas sexuales, el incremento de los estrógenos y el aumento de la actividad de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa, que biotransforma la testosterona en DHT en el estroma, desempeñando un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad (Roehrborn & Rosen, 2008). El aumento de los estrógenos tiene efectos sobre el crecimiento anómalo en las células epiteliales y un incremento en la proliferación de células del estroma de la próstata

Aunque la HBP y el CaP son hormono-dependientes, no se ha podido identificar una relación directa entre el desarrollo de HBP y el cáncer prostático.



Teniendo en cuenta la división anatómica de la glándula prostática más del 80% de los tumores prostáticos se dan en la zona periférica, y un 10%-20% a nivel periuretral, sin embargo, las áreas afectadas por la HBP se ocasionan en la zona transicional (McNeal, 1981).

La incidencia de la HBP se incrementa con la edad y se estima que el 65-70% de los hombres de 70 años han desarrollado esta patología. Aunque generalmente es asintomática, algunos pacientes pueden sufrir síntomas obstructivos del tracto urinario (Chughtai et al., 2016).

### **1.5 El cáncer de próstata: aspectos generales**

El cáncer de próstata se clasifica como adenocarcinoma dado que el 95% de los casos se desarrolla a partir de una proliferación desmedida de las células lumbinales en los ductos prostáticos, con ruptura de la membrana basal e invasión del estroma (Udensi & Tchounwou, 2016).

Es el tumor más frecuente en el varón y se presenta generalmente en pacientes de edad avanzada de forma latente sin manifestar síntomas clínicos. Sin embargo, puede tornarse sumamente agresivo y diseminarse más allá de la próstata invadiendo tejidos cercanos como vejiga, vesícula seminal y recto o metastatizar a los nódulos linfáticos, hueso, pulmón y otros órganos (Schulz et al., 2003). Se estima que entre el 15% y el 30% de los hombres mayores de 50 años, y el 80% de los hombres mayores de 80 años, presentan CaP no diagnosticado y microscópico (Taichman et al., 2007). Muchas lesiones en la próstata contienen infiltrados inflamatorios crónicos o agudos que se asocian con atrofia focal del epitelio de la glándula, desencadenando un estadio premaligno, que implica una serie de mutaciones en las líneas germinales, alteraciones cromosómicas, hipermetilación del DNA, etc.

En la zona periférica de la próstata y como respuesta a un proceso inflamatorio de forma crónica o aguda debida a factores desconocidos (patógenos, enfermedades autoinmunes, dieta, etc.), se observa un incremento en la proliferación de las células epiteliales, posiblemente estimulado por el estado inflamatorio, adquiriendo un fenotipo intermedio entre las células basales y las lumbinales; este tipo de lesión se denomina atrofia proliferativa inflamatoria (PIA)



(De Marzo et al., 2007). Estas células epiteliales están sujetas a procesos moleculares de estrés, que en algunas células puede desencadenar inestabilidad genómica y promover la transición hacia un estadio de mayor progresión de la enfermedad.

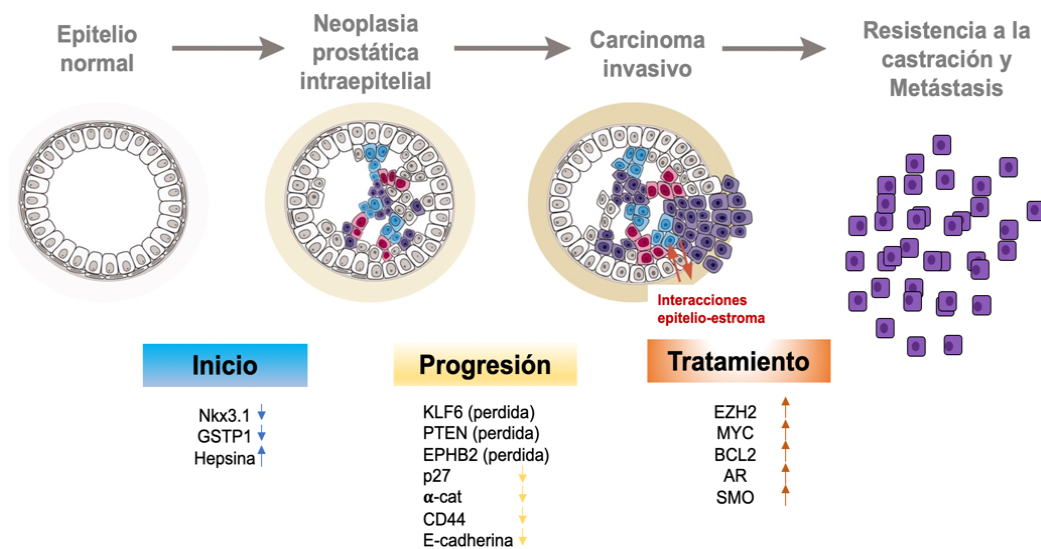
En zonas adyacentes a las lesiones de PIA se observan zonas con otro tipo de lesión preneoplásica denominada neoplasia prostática intraepitelial (PIN) (**Figura 6**). Estas lesiones son consideradas las precursoras del establecimiento y desarrollo del tumor en el tejido prostático. Las PIN se caracterizan por una proliferación intraluminal de las células epiteliales secretoras del sistema ductal-acinar; normalmente afectan a la zona periférica de la glándula prostática y son consideradas unas lesiones precursoras del cáncer, ya que presentan características genéticas similares e histológicamente una pérdida de la diferenciación celular, aunque este tipo de tumor no sea invasivo. Se pueden clasificar en dos grados: un PIN de bajo grado, donde se incluye un grado I (baja malignidad), y otro de alto grado que incluiría los grados II y III (alta malignidad), el último de los grados se asocia con carcinoma en el 80% de los casos (Bostwick & Cheng, 2012).

En las PIN de bajo grado la capa de células basales está intacta u ocasionalmente interrumpida, al contrario que en las lesiones de alto grado, donde la interrupción es frecuente. La afección de bajo grado puede aparecer en hombres a temprana edad, pero no necesariamente padecerán cáncer; sin embargo, la incidencia y extensión en los hombres que tienen PIN de alto grado aumenta a partir de los 50 años. En una biopsia prostática, la importancia clínica de las PIN de alto grado radica en la asociación que tiene con el riesgo aumentado de CaP, identificándose en casi el 82% de las próstatas con adenocarcinoma (Vasioukhin, 2004).

En sus etapas iniciales, cuando el CaP está confinado en la próstata, la enfermedad puede ser manejada con tratamientos activos quirúrgica y/o radioterapia o si es de bajo riesgo/intermedia con vigilancia activa (Mottet et al., 2021). Si no es detectado a tiempo, el CaP puede invadir las vesículas seminales y metastatizar.

El desarrollo de metástasis es un evento alarmante ya que, en estadios avanzados de la enfermedad, más del 80% de los pacientes desarrollarán metástasis óseas que producen lesiones que generan dolor y disminuyen drásticamente la calidad y la supervivencia de los pacientes (Sturge et al., 2011). En estos estadios la enfermedad se torna incurable y la terapia se centra en mejorar la calidad de vida de los pacientes con cuidados paliativos. Aunque el tumor se encuentre restringido en la glándula, ya es dependiente de andrógenos para su crecimiento; al metastatizar, se puede volver independiente de esta hormona, estadio que se conoce como “resistente a la castración” (CRPC) (Mottet et al., 2021).

Histológicamente, el CaP es un aumento de la proliferación celular asociada con una pérdida progresiva de la membrana basal en la glándula prostática, seguido de anomalías en los marcadores de diferenciación, incremento en el tamaño nuclear de las células y variación del contenido genómico ocasionando inestabilidad genómica, y un aumento en la proliferación celular (Figura 6).



**Figura 6.** Modelo de progresión del cáncer de próstata. Las características morfológicas de las diferentes etapas de progresión del cáncer se correlacionan con eventos genéticos y epigenéticos específicos. La delección o la inactivación de la mutación de los genes supresores de tumores se denota como pérdida. La sobreexpresión de un gen se muestra con una flecha apuntando hacia arriba, mientras que la regulación negativa de la expresión se muestra con una flecha apuntando hacia abajo. Adaptación (Rybak et al., 2015; Vasioukhin, 2004).

## 1.6 Metástasis en el cáncer de próstata

La enfermedad metastásica es la principal causa de muerte asociada al cáncer de próstata. Los ganglios linfáticos adyacentes a los tumores primarios son a menudo el primer sitio de metástasis, seguidos del hígado, los pulmones y los huesos. Las metástasis óseas en el cáncer de próstata se presentan con mayor frecuencia como lesiones osteoblásticas con características osteolíticas mixtas, que causan dolor intenso, hipercalcemia y fracturas frecuentes (Datta et al., 2010).

El desarrollo de metástasis requiere que ocurran una serie específica de eventos que involucran una compleja sucesión de cambios en las células epiteliales que conforman el tumor: 1) invasión local a través de la matriz extracelular (ECM), 2) intravasación, 3) supervivencia en el torrente sanguíneo, 4) extravasación, 5) formación de nichos y establecimiento de micrometástasis y 6) reinicio de los programas proliferativos generando crecimientos neoplásicos detectables. Esta serie de eventos es conocida como la cascada de invasión y metástasis y se postula que es posible gracias a la activación de un proceso denominado transición epitelio mesénquima (EMT) (Thiery, 2002).

La EMT confiere a las células epiteliales las características necesarias para iniciar los procesos de invasión y metástasis, aumento de la movilidad, la capacidad de degradar los componentes de la ECM y de invadir el estroma circundante (Lamouille et al., 2014).

Se ha establecido que el desarrollo de metástasis es un proceso que comienza una vez avanzada la enfermedad, en etapas tardías del proceso tumorigénico. Algunos autores han encontrado características asociadas a EMT en estadios tempranos, incluso en lesiones preneoplásicas (Harper et al., 2016). Por otro lado, se ha observado que las células neoplásicas que inician los programas de EMT adquieren la capacidad de actuar como células iniciadoras de tumor, una característica definitoria de las células madre tumorales (CSCs) (Zhou et al., 2016).

La diseminación de células con características de CSCs sería un evento clave para la progresión de la cascada de invasión y metástasis, ya que dichas células deben poder actuar como células iniciadoras de tumor y ser las fundadoras de una colonia metastásica. En relación con esto, algunos autores han encontrado que células con características del tipo mesenquimal son más resistentes a radio y quimioterapia. La resistencia a estas terapias es otra característica fundamental de las CSCs (Kurrey et al., 2009).

Las células de cáncer de próstata se diseminan a la circulación como células tumorales circulantes (CTC) y superan varias barreras físicas para establecer metástasis óseas, atravesar las paredes sinusoides y el estroma de la médula ósea y luego migrar a la superficie del hueso endosteal a través de sinusoides dentro de la cavidad de la médula ósea (Body et al., 2015).

Una vez que las células de cáncer de próstata colonizan la médula ósea, la interacción entre las células cancerosas y el microambiente óseo da como resultado un "ciclo vicioso" de formación y destrucción ósea, un proceso que apoya la supervivencia de las células cancerosas y el crecimiento tumoral. Los factores de crecimiento secretados por las células de cáncer de próstata, incluida la endotelina 1 (ET-1), la adrenomedulina, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), pueden estimular la activación de osteoblastos (Body et al., 2015). Además, las proteasas secretadas por tumores, como las metaloproteinasas de matriz, el PSA y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, promueven la liberación de factores de crecimiento que inducen osteoblastos, incluido el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento de tipo insulina, y PDGF, para promover aún más la diferenciación de osteoblastos de las células madre mesenquimales (G. Wang et al., 2018). Todo ello puede dar lugar a un microambiente favorable para la progresión del tumor (Arap et al., 2020).

### **1.7 Clasificación del cáncer de próstata**

Los sistemas para clasificar en qué fase se encuentra un tumor de próstata son variados en función del método utilizado e imprescindibles ya que la terapia depende del estadio clínico del tumor. La clasificación del paciente con CaP se suele hacer en base a la extensión del tumor (TNM), el grado histopatológico (Gleason), el estadio clínico y el factor de riesgo o pronóstico.

#### **Clasificación TNM. Estudio de la extensión del cáncer de próstata**

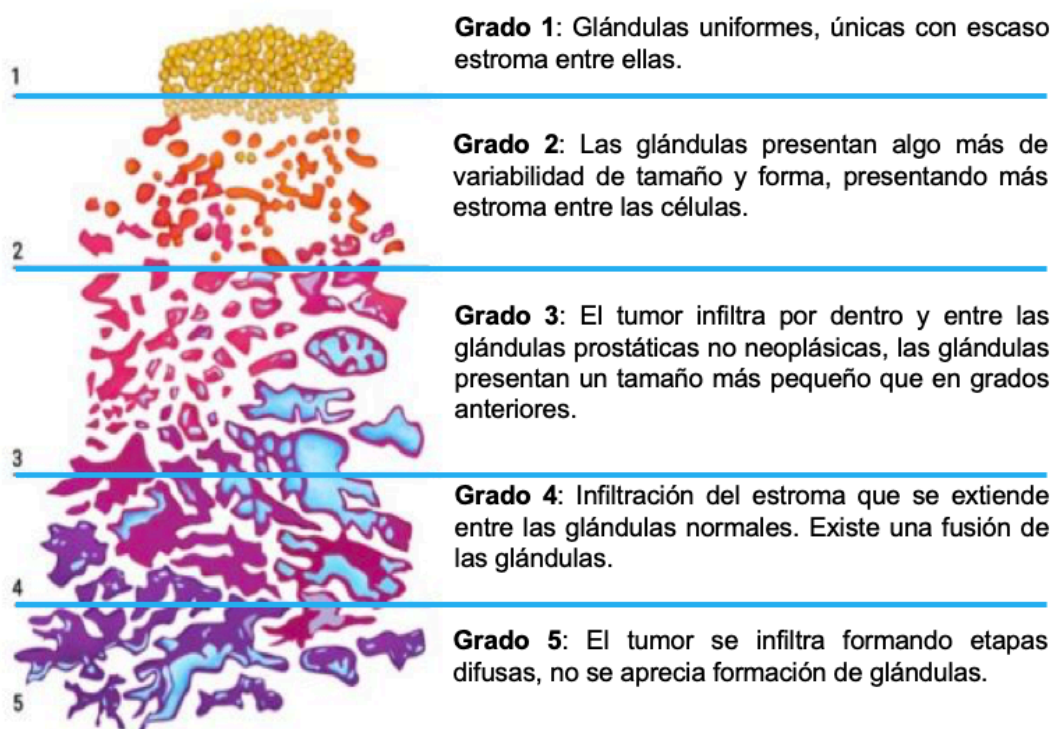
Se fundamenta en la evaluación de la extensión del tumor, el número de ganglios afectados y la presencia o no de metástasis a distancia, según la clasificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), (**Tabla 1**). En el TNM, se define como T1 al tumor que es clínicamente no evidente, impalpable y no visible en estudios de imágenes. El cáncer detectado sin extensión extra glandular se considera T2 y cuando se extiende por fuera de la cápsula se establece como T3. Se clasifica como T4 cuando existe una invasión de órganos adyacentes distintos a las vesículas seminales. Si los ganglios linfáticos regionales están comprometidos, se considera N1; mientras que la afectación de ganglios linfáticos no regionales y/o la presencia de metástasis (en los huesos o en otras localizaciones) son clasificadas como M1 (Vallejos et al., 2013).

**Tabla 1.** Clasificación TNM del cáncer de próstata.

<b>T: Tumor Primario</b>	
<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor primario
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>T1</b>	Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante pruebas de imagen
	T1a Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido reseado
	T1b Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor al 5% del tejido reseado
	T1c Tumor identificado mediante punción biopsica
<b>T2</b>	Tumor confinado en la próstata
	T2a El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos
	T2b El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos
	T2c El tumor abarca ambos lóbulos
<b>T3</b>	Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática
	T3a Extensión extracapsular unitareal o bilateral
	T3b Tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es
<b>T4</b>	Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica
<b>N: Ganglios Linfáticos Regionales</b>	
<b>Nx</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
<b>N0</b>	No se demuestran metástasis ganglionares regionales
<b>N1</b>	Metástasis en ganglios linfáticos regionales
<b>M: Metástasis a distancia</b>	
<b>Mx</b>	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia
	M1a Ganglio/s linfático/s no regionales
	M1b Hueso/s
	M1c Otra/s localización/es

### Clasificación del grado histopatológico (puntuación de Gleason)

El sistema de puntuación desarrollado por Gleason es el más utilizado para la determinación de los grados de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento en relación con el estroma del adenocarcinoma de próstata. El sistema de Gleason tiene en cuenta la disposición de las células tras el análisis histológico de la muestra tumoral y asigna una puntuación en una escala de 1 a 5 (de mayor a menor diferenciación) (**Figura 7**), identifica cinco patrones histológicos de crecimiento del adenocarcinoma prostático en una escala progresivamente decreciente de diferenciación glandular que se determina a partir de las muestras de tejido que se han recogido de la próstata.



**Figura 7.** Representación anatomopatológica del estadio Gleason. Adaptación (*Cáncer de Próstata: Estadios y Grados* | *Cancer.Net*, n.d.)

Los patrones arquitectónicos primarios (predominante) y secundarios (el segundo en cuanto a prevalencia) son identificados y se les asigna un grado de 1 a 5, siendo 1 el más diferenciado. Como los patrones primario y secundario influyen en el pronóstico, existe una suma o puntuación de Gleason que se obtiene por la adición de ambos grados.

Si un tumor tiene sólo un patrón histológico, por razones de uniformidad a los patrones primario y secundario se les asigna el mismo grado. Las puntuaciones de Gleason van desde 2 ( $1+1=2$ ), que representa tumores de composición uniforme con patrón 1 de Gleason, hasta 10 ( $5+5=10$ ), que representa a tumores totalmente indiferenciados (N. Chen & Zhou, 2016).

### **Sistema de puntuación de Gleason modificado**

La escala de Gleason se ha categorizado como la clasificación global y estándar para el cáncer de próstata por numerosas organizaciones, incluyendo la Organización Mundial de la Salud (OMS) y UICC. El sistema de puntuación de Gleason ha variado con el paso de los años, sus dos mayores modificaciones se realizaron en 2005 con el consenso de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) y en 2014 en su segunda convocatoria.

En el primer consenso se confirmó que los patrones de Gleason 1 y 2 no deben ser asignados en los informes de biopsia por aguja fina en especímenes de próstata, sino que estos patrones poco comunes se deben restringir a tumores ocasionales usualmente originados en la zona de transición y que solamente son diagnosticados mediante una resección transuretral de próstata o prostatectomía radical. Además, se decidió que todas las áreas cribiformes del tumor son mejor catalogadas en un patrón 4 de Gleason, no así en un 3 como se venía realizando hasta ese momento. Como consecuencia de estas decisiones, las puntuaciones y la suma de los patrones primario y secundario ya no abarcan de 2-10, sino que se limitan a una puntuación de 6-10 (Pierorazio et al., 2013).

Las recomendaciones resultantes del consenso de 2014 fueron un desarrollo adicional de la clasificación de Gleason modificada por ISUP en 2005. En el sistema del 2014, los criterios morfológicos se aclaran, incluidas las definiciones actualizadas del patrón de Gleason 4. Además del informe que las puntuaciones de Gleason sean  $\leq 6$ ,  $3+4=7$ ,  $4+3=7$ , 8 y 9-10, respectivamente, se informaron como cinco grupos, es decir grados ISUP 1–5 (**Tabla 2**) (Egevad et al., 2016).



Las modificaciones de mayor importancia realizadas a la escala fueron la eliminación de los patrones 1 y 2 de Gleason y la inclusión de todo patrón cribiforme en la categoría de Gleason 4.

**Tabla 2.** Sistema Gleason modificado de la ISUP. Adaptación (Srigley et al., 2016)

<b>Grado ISUP</b>	<b>Puntuación de Gleason</b>	<b>Definición</b>
<b>1</b>	2-6	Glándulas individuales, discretas y bien formadas
<b>2</b>	3+4=7	Predominantemente glándulas bien formadas con un menor componente de glándulas cribiformes, fusionadas o pobremente formadas.
<b>3</b>	4+3=7	Predominantemente glándulas cribiformes, fusionadas y mal formadas con un menor componente de glándulas bien formadas.
<b>4</b>	4+4=8	Glándulas cribiformes, mal formadas, fusionadas.
	3+5=8	Predominantemente glándulas bien formadas y un menor componente sin glándulas o con necrosis.
	5+3=8	Ausencia de diferenciación glandular o necrosis y un menor componente de glándulas bien formadas.
<b>5</b>	9-10	Ausencia de diferenciación glandular o necrosis con o sin glándulas cribiformes, mal formadas o fusionadas.

Las modificaciones realizadas a la escala de Gleason y el sistema de gradación ISUP representan un avance significativo y permiten categorizar a los pacientes de una manera más precisa según los hallazgos histopatológicos del tumor y su pronóstico.

### **Clasificación según factores de riesgo (clasificación de D'Amico)**

El modelo desarrollado por D'Amico en 1998 se utiliza para evaluar el riesgo de recidiva y determinar las opciones de tratamiento más adecuadas en pacientes con CaP localizado. Clasifica a los pacientes en categorías de riesgo: bajo, intermedio o alto, tomando en cuenta factores predictivos como: la puntuación de Gleason, el tamaño del tumor y la concentración de PSA (D'Amico et al., 1998).

**Tabla 3.** Factores de riesgo, clasificación de D'Amico.

	<b>Bajo Riesgo</b>	<b>Riesgo Intermedio</b>	<b>Riesgo Alto</b>	
<b>Definición</b>	PSA <10 ng/ml	PSA 10-20 ng/ml	PSA >20 ng/ml	<> PSA
	GS <7	GS 7	GS 8-10	<> GS
	cT1-2a	cT2b	cT2c	cT3-4 y cN+
	<b>Localizado</b>			<b>Localmente Avanzado</b>

La supervivencia de los pacientes sin recidiva bioquímica a los 5 años estando estratificados en riesgo bajo es del 80%, en el riesgo intermedio 60% y en aquellos que se encuentran en la categoría de riesgo alto, un 30%.

### 1.8 Etiología del cáncer de próstata

Como en muchos otros tipos de cáncer, el CaP se desarrolla por una acumulación de mutaciones somáticas y cambios epigenéticos (Arap et al., 2020), resultando en la activación de oncogenes y en la inactivación de genes supresores tumorales (Witte, 2009). A pesar de que no se conocen con exactitud las causas que desencadenan el CaP, factores de riesgo como la edad, el nivel hormonal, la dieta, la historia familiar o el estilo de vida, pueden influir en el desarrollo de la enfermedad. La incidencia del cáncer aumenta a medida que aumenta la edad. Su diagnóstico es raro en hombres menores de 44 años, pero a partir de esta edad su incidencia se incrementa. El envejecimiento en los hombres va acompañado de una progresiva disminución en la producción de testosterona sérica, especialmente a partir de los 40 años. Se ha sugerido que, en cierta medida, la próstata puede mantener los niveles funcionales intra-prostáticos de andrógenos incrementando la expresión del receptor de andrógenos y de las enzimas implicadas en la biosíntesis de andrógenos. Pero estos mecanismos de adaptación podrían intensificarse con la edad llegando a alcanzar el límite de capacidad compensatoria, lo cual podría incrementar las tasas de mutación y procesos de evolución maligna en las células prostáticas (Sridhar et al., 2014).

La adquisición de los factores de riesgo descritos previamente, promueven la progresión tumoral al menos en parte a la señalización aberrante del AR que conducen a la tumorigénesis prostática y su transición hacia el fenotipo resistente a la castración.

### **1.9 Diagnóstico del cáncer de próstata**

Generalmente el CaP se diagnostica por la medición repetida en un período de tiempo de un nivel elevado del PSA y por un examen rectal digital anormal (DRE).

El PSA, como mencionamos anteriormente, es una serin-proteasa secretada por las células epiteliales de la próstata que puede ser detectada en sangre. El valor crítico de PSA en suero es de 4 ng/ml, si bien valores por debajo de estos niveles entre 2,5 y 4 presentan un número importante de tumores y hemos de ajustarlos en relación con factores como la edad, o las formas libres o complejas del PSA (Mottet et al., 2021; Thompson et al., 2004).

Este es un marcador órgano-específico, con alta sensibilidad pero baja especificidad para la detección del cáncer de próstata, existiendo situaciones que provocan una elevación temporal de los niveles de PSA, como son las manipulaciones de la glándula prostática (tacto rectal, ultrasonografía transrectal y biopsia, entre otras) (Cabarkapa et al., 2016). Patologías no tumorales se han relacionado con elevaciones de los valores de PSA sérico provocando falsos positivos en la detección de CaP basada en la determinación de los niveles de esta enzima. Bajo esta condición, se realizan biopsias de próstata innecesarias y, en ocasiones, pueden mostrar la presencia de patrones de inflamación de la glándula pese a no asociarse a sintomatología.

El DRE es una prueba que examina la parte inferior del recto y la glándula prostática para identificar anomalías en el tamaño, forma o textura. Actualmente este marcador es un indicador para la detección temprana de una patología prostática, ya que los casos hallados por DRE suelen ser tumores avanzados.

Sin embargo, el DRE permite detectar casos de CaP con PSA normal, ya que este marcador puede elevarse temporalmente por otras afecciones prostáticas no-tumorales (Naji et al., 2018). Por lo tanto, suelen usarse ambos métodos en paralelo (Catalona et al., 1998).

La prueba determinante en el diagnóstico del CaP es una biopsia tradicional, que consiste en la obtención de muestras de tejido tumoral y analizarlos mediante histoquímica o inmunohistoquímica, suponiendo una práctica muy invasiva y en ocasiones arriesgada para el paciente. El tejido tumoral es la muestra de referencia en el estudio de biomarcadores para el uso de terapias dirigidas; sin embargo, su obtención presenta múltiples limitaciones (Kleppe & Levine, 2014).

La próstata es un órgano de difícil acceso, por lo que obtener una muestra representativa y suficiente para realizar un estudio molecular adecuado puede ser complicado (Jamal-Hanjani et al., 2015). Si la muestra no es adecuada, debe plantearse la re-biopsia, con el consecuente riesgo para el paciente que debe volver a someterse a un procedimiento invasivo.

Además, los tumores presentan una enorme heterogeneidad, de forma que cada zona del tumor puede presentar unas características propias y provocar que la muestra analizada no sea representativa de la totalidad de las células tumorales, lo que puede producir resultados discordantes entre muestras de un mismo paciente (Mattox et al., 2019). Las características moleculares pueden ir cambiando con el desarrollo de la enfermedad debido a que los tumores no son estáticos. La selección de subclones resistentes debido al uso de fármacos dirigidos puede intervenir en la aparición de nuevas alteraciones genéticas, que producen diferencias moleculares entre el tumor primario y sus metástasis.

De las limitaciones de la biopsia tradicional (dificultad para obtener el tejido, muestra poco representativa de la heterogeneidad del tumor y dificultad o incapacidad para obtener muestras seriadas a medida que avanza el tratamiento) emergen las “biopsias líquidas” como estrategia alternativa para el estudio de biomarcadores (Hench et al., 2018).

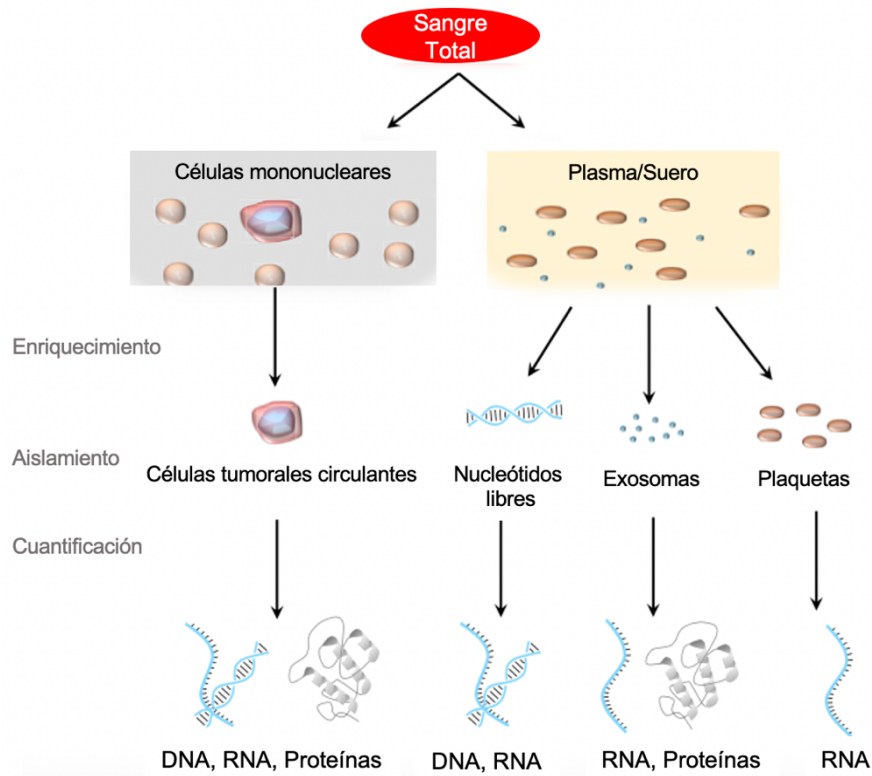
## 2 Biopsia Líquida

La biopsia líquida es un nuevo concepto de diagnóstico que proporciona información importante para monitorizar e identificar genomas tumorales en muestras de fluidos corporales.

En la sangre periférica se pueden detectar tanto células tumorales circulantes como biomoléculas de origen tumoral, tales como DNA tumoral circulante (ctDNA), RNA de transferencia (tRNA), microRNA (miRNA), RNA largo no codificante (lncRNA), exosomas, etc. También se pueden detectar plaquetas “educadas” por el tumor (TEPs) (**Figura 8**). La determinación de estos marcadores permite la detección del cáncer, el diagnóstico en etapa temprana y la evaluación de la respuesta a la terapia a través de medios mínimamente invasivos (Mattox et al., 2019; Soda et al., 2019).

Las biopsias líquidas pueden detectar recurrencias tempranas antes de que los tumores se vuelvan radiográfica o clínicamente aparentes, lo que potencialmente brinda una oportunidad más amplia durante la cual los regímenes de tratamiento podrían ser modificados. Una vez que un paciente recae, las biopsias líquidas pueden revelar nuevas mutaciones no presentes en el tumor primario que podrían guiar las elecciones para la terapia de segunda línea.

Las biopsias líquidas en el diagnóstico inicial pueden ser útiles para el pronóstico y una ventaja es que reflejan un muestreo aleatorio de todas las alteraciones en un tumor, mientras que las biopsias individuales de tumores primarios son inadecuadas para revelar heterogeneidad dentro de los tumores (Mattox et al., 2019).



**Figura 8.** Fuentes de biopsia líquida. La sangre se puede separar en diferentes fracciones para enriquecer los biomarcadores asociados a tumores. A partir de la fracción de células mononucleares, las CTCs pueden proporcionar información genómica, transcriptómica y proteómica sobre el tumor. Desde plasma o suero, los nucleótidos (DNA-RNA) y exosomas libres. Las plaquetas educadas por tumores llevan información adicional sobre la ubicación del tumor en su mRNA. Adaptación (Joose & Pantel, 2015).

## 2.1 Plaquetas “educadas” por tumores

Las plaquetas son células hematopoyéticas anucleadas con un tamaño de 2-4  $\mu\text{m}$  liberadas por megacariocitos de médula ósea en el torrente sanguíneo. En personas sanas, la concentración de plaquetas circulantes es de aproximadamente  $150\text{-}350 \times 10^9/\text{L}$  y tienen una vida media de 7 a 10 días. Los principales orgánulos de la plaqueta son la membrana plasmática, el citoesqueleto, el sistema canalicular abierto, el sistema tubular denso y los gránulos. La membrana plasmática de la plaqueta, media las interacciones con el medio externo, por lo que cumple un papel central en su fisiología. Es una típica unidad de membrana con un contenido particular de fosfolípidos, glicolípidos y glicoproteínas. Las glicoproteínas clásicas han sido subclasificadas en distintas familias: integrinas, glicoproteínas ricas en leucina y selectinas.

Las integrinas son una familia de proteínas de adhesión celular que median el entorno celular y extracelular para regular la unión, la supervivencia y la motilidad. Además, modulan diversas patologías que incluyen enfermedades trombóticas, enfermedades infecciosas, inflamación, fibrosis y cáncer (Goodman & Picard, 2012). A través de la comunicación entre la célula y el entorno extracelular, la activación de señales de los receptores de crecimiento y las funciones potenciales en la neoangiogénesis inducida por tumores, las integrinas desempeñan un papel importante en el crecimiento y la metástasis en el cáncer.

La integrina alfa-IIb (ITGA2B), también conocida como glucoproteína plaquetaria IIb del complejo IIb/IIIa, es el receptor más abundante en la superficie plaquetaria. Al mediar la comunicación plaqueta-plaqueta, asume un papel muy importante en la hemostasia (Rivera et al., 2009). Las mutaciones en el gen *ITGA2B* están asociadas con trastornos hemorrágicos de tipo plaquetario, que se caracterizan por un fallo de la agregación plaquetaria, incluida la trombostenia de Glanzmann (Nurden & Pillois, 2018).

Las plaquetas están equipadas con mecanismos de procesamiento de RNA, como el empalme previo al mRNA, el procesamiento y la traducción del mRNA. Como las plaquetas carecen de núcleo, la mayoría de las transcripciones de RNA en las plaquetas se derivan de los megacariocitos durante la trombocitogénesis. Sin embargo, las plaquetas también pueden ingerir moléculas de RNA durante la circulación o interactuar con otros tipos de células, como las células tumorales (Sol & Wurdinger, 2017).

Las células tumorales pueden "educar" a las plaquetas al modular sus perfiles y fenotipos de RNA. Diversos estudios sugieren cambios en los perfiles de RNA de las plaquetas en varios tipos de cáncer, incluidos los de pulmón, próstata, glioma y carcinoma de mama.

### 2.1.1 Plaquetas “educadas” por tumores (TEPs) en cáncer

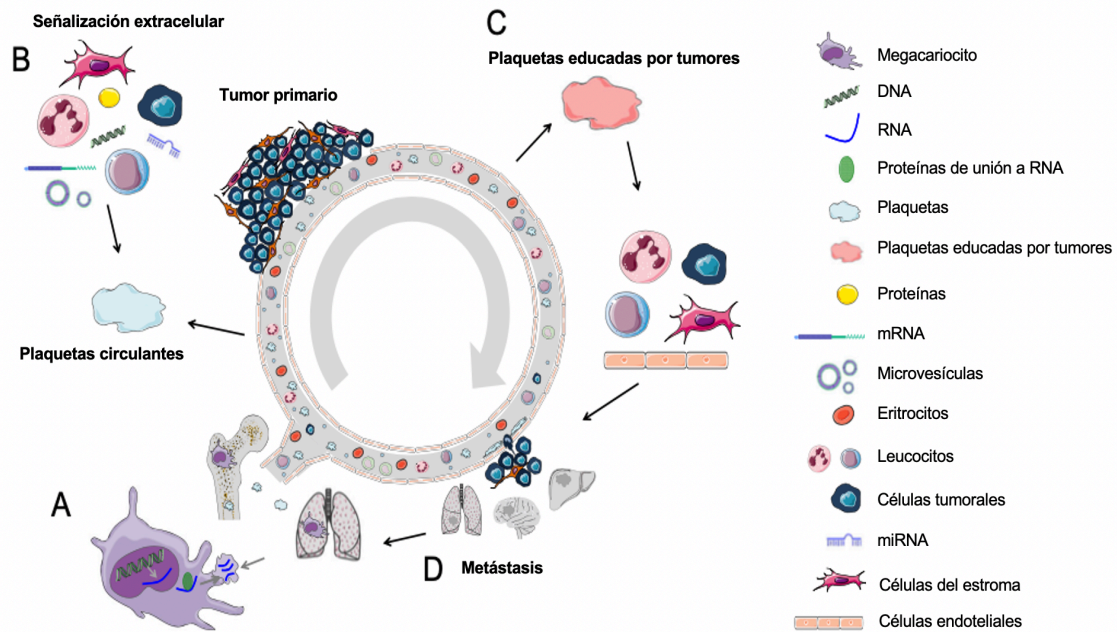
Las plaquetas están implicadas en la biología tumoral y la metástasis (**Figura 9**) (McAllister & Weinberg, 2014), y las células tumorales pueden, directa e indirectamente, imponer cambios en su contenido de RNA y proteínas (Nilsson et al., 2011). Como resultado, estas TEPs tienen una función alterada y pueden promover la supervivencia y metástasis de las células tumorales, así como otras características distintivas del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Las células tumorales interactúan con las plaquetas indirectamente a través de diferentes moléculas de señalización o directamente a través de diferentes receptores, principalmente el receptor de activación plaquetaria P-selectina (Borsig, 2008).

Tras la activación, las plaquetas pueden liberar varios factores de crecimiento y pro-angiogénicos como PDGF, BFGF, EGF, TGF- $\beta$ , VEGF-A y VEGF-C (Menter et al., 2014). Las plaquetas pueden liberar estos factores en un nicho metastásico, proporcionando así un microambiente de crecimiento pro-tumoral.

Además, las plaquetas alteran a las células cancerosas para evadir la detección por parte del sistema inmunitario, transfiriendo proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I a las células tumorales, lo que da como resultado la protección contra las células NK (Placke et al., 2012).





**Figura 9.** Representación esquemática de la educación de plaquetas mediada por tumores. **(A)** Los megacariocitos en la médula ósea y los pulmones clasifican RNA y proteínas específicas en precursores de plaquetas. **(B)** Las plaquetas circulantes contienen una variedad de transcripciones de RNA y proteínas. Durante su vida útil de 7 a 10 días, las plaquetas interactúan con las células inmunes, las células tumorales y las células del estroma. Estas interacciones directas, así como la señalización de células distantes, por ejemplo, a través de la comunicación mediada por vesículas en sangre, cambia el contenido de la función plaquetaria. **(C)** Este proceso conduce al desarrollo de TEPs. A continuación, las plaquetas educadas por tumores pueden influir en el proceso de formación de metástasis al estimular o bloquear las células inmunes, las células endoteliales, las células del estroma y las células cancerosas, ya sea por contacto directo de célula a célula o mediante la liberación de colas extracelulares. **(D)** Finalmente, la metástasis podría afectar la clasificación de RNA específicos y proteínas de megacariocitos en plaquetas. Adaptación (Sol & Wurdinger, 2017).

Las plaquetas pueden además proteger mecánicamente a las células cancerosas de su destrucción a través de las células NK al formar un agregado de células-fibrina-plaquetas que rodea las células tumorales circulantes o las células tumorales detenidas. Este escudo físico evita la detección inmune mediada por células y apoya la supervivencia de las células cancerosas (Labelle et al., 2011). Tales propiedades protectoras de las plaquetas son importantes para la metástasis al promover la supervivencia de las células cancerosas en la circulación (Buergy et al., 2012).

Las células tumorales liberan numerosos agonistas de plaquetas, incluidos ADP, trombina y tromboxano. Además, las células cancerosas, a través de su transformación oncogénica, tienen la capacidad de producir micropartículas que se liberan en el torrente sanguíneo y participan en la activación plaquetaria, contribuyendo a los estados protrombóticos presentes en pacientes con cáncer.

Las plaquetas contienen una gran cantidad de factores de crecimiento que contribuyen al crecimiento del tumor y la angiogénesis. Además, la agregación plaquetaria alrededor de las células tumorales brinda numerosas ventajas a las células cancerosas: escape de la vigilancia inmunológica, señales pro-supervivencia, adhesión al endotelio y extravasación. La activación de plaquetas parece ser crítica para el crecimiento tumoral y la metástasis (Sol & Wurdinger, 2017).

Todo lo anterior sugiere que el concepto emergente de plaquetas educadas en tumores puede proporcionar herramientas interesantes para el diagnóstico del cáncer.

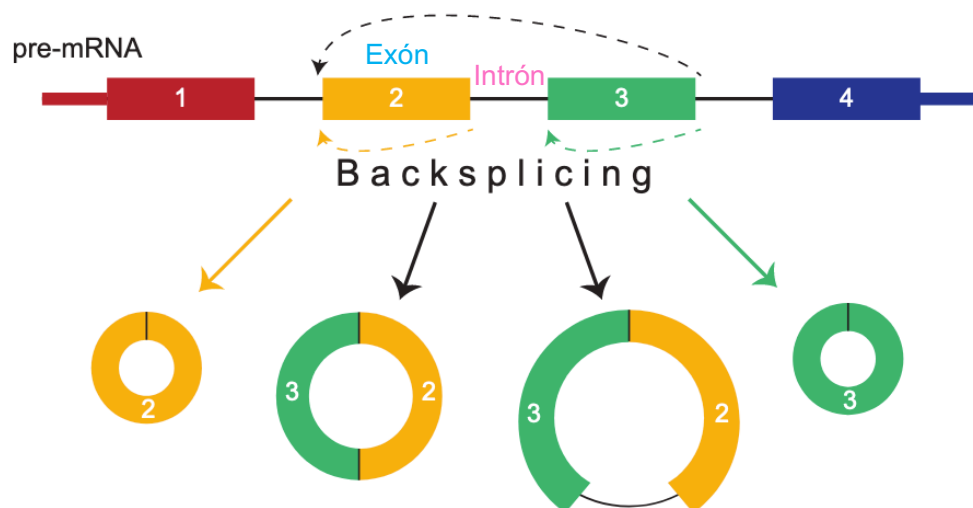
## **2.2 RNA circular**

En las últimas décadas se ha visto una lista cada vez mayor de variantes de RNA no codificantes (ncRNA) con capacidad funcional (Morris & Mattick, 2014). Más del 75% de los RNA no codificantes se han encontrado en la transcripción del genoma humano (Wallaert et al., 2017). Los RNA circulares (circRNA), de 100 pb a 4 kb de tamaño, se consideraron subproductos no funcionales del procesamiento aberrante en el RNA (Qu et al., 2015).

Algunos circRNA son abundantes y están conservados evolutivamente, y muchos otros ejercen funciones biológicas importantes al actuar como miRNA o inhibidores de proteínas (esponjas), al regular la función de las proteínas o al traducirse ellos mismos. Además, se han implicado en enfermedades como diabetes, trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kristensen et al., 2019).

Los circRNA son biomoléculas endógenas, cuyos extremos 3' y 5' están unidos covalentemente, constituyen una clase de RNA recientemente descubierto como extendido y abundante (Salzman et al., 2012). Los circRNA generalmente se forman mediante un empalme alternativo de pre-mRNA (**Figura 10**), en el que un aceptor de empalme aguas arriba se une a un donante de empalme aguas abajo formando un *loop* continuo en un proceso conocido como “back splicing” (empalme posterior) (Starke et al., 2015).

Los circRNAs generalmente se clasifican en tres tipos: circRNAs exónicos (ecircRNAs), circRNAs exónicos-intrónicos (ElciRNAs) y circRNAs intrónicos (ciRNAs). La mayoría de los circRNA exónicos existen en el citoplasma, mientras que los otros dos se encuentran principalmente en el núcleo celular. Existen algunos circRNA en los fluidos del cuerpo humano, por lo que son fáciles de detectar. La mayoría de los circRNA son extremadamente abundantes, relativamente estables y se expresan ampliamente en las células eucariotas, lo que sugiere que los circRNA tienen funciones reguladoras potenciales (L.-L. Chen & Yang, 2015).



**Figura 10.** Empalme de circRNA y diversidad de isoformas. Se puede generar una gran diversidad de circRNA a partir de un sólo locus genómico, éstos se crean a través de un proceso de empalme no canónico conocido como empalme posterior. Dichos circRNA pueden consistir en uno o más exones e incluso contienen secuencias intrónicas no empalmadas. Adaptación (Barrett & Salzman, 2016).

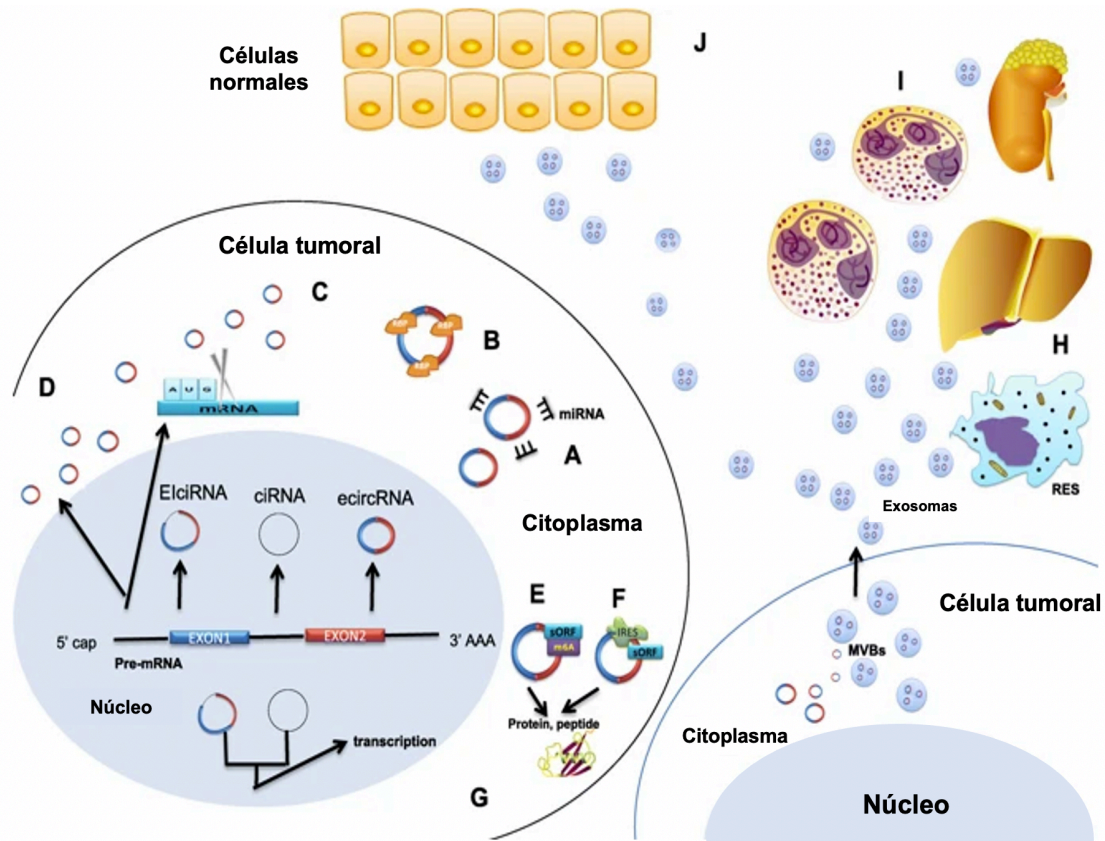
Algunos circRNA descubiertos en tejidos humanos se han relacionado con diversos procesos celulares, como la senescencia, el crecimiento y la apoptosis, etc. Además, se han identificado perfiles de expresión de circRNA desregulados correlacionados con algunos tipos de cáncer, lo que sugiere que los circRNA pueden funcionar como inhibidores o aceleradores tumorales.

La evidencia emergente de que los circRNA son reguladores importantes en el cáncer implica que podrían servir como nuevos biomarcadores clínicos (Z. Zhang et al., 2018).

### **2.2.1 Mecanismos de regulación de los circRNA**

El más notable de los mecanismos de regulación de los circRNA es que pueden funcionar como esponjas de miRNA. Los circRNAs pueden bloquear la unión de miRNAs con el extremo 3'-UTR de un gen específico al unirse directamente a miRNAs, regulando indirectamente la expresión génica (Ashwal-Fluss et al., 2014). Por ejemplo, ciRS-7 puede funcionar como una esponja de miR-7 y, en consecuencia, reprime su función en el cáncer (Peng et al., 2015). Un segundo mecanismo es que los circRNA juegan compiten con la producción de mRNA en el procesamiento del pre-mRNA. Un tercer mecanismo implica a las proteínas de unión a RNA (RBP) a las cuales se unen actuando como reguladores de la transcripción.

Además, los circRNA pueden servir como trampas de mRNA, otra forma de empalme alternativo, y eliminar los codones de inicio de los mRNA maduros para reducir la traducción de proteínas en el cáncer (**Figura 11**) (Song et al., 2018).



**Figura 11.** La regulación de los circRNA en el cáncer. **A)** Los circRNA funcionan como esponjas de miRNA. **B)** Los circRNA se unen a las RBP como reguladores de la transcripción. **C)** Los circRNA eliminan los codones de inicio de los mRNA maduros para reducir la traducción de proteínas. **D)** La producción de circRNA compite con el empalme canónico de pre-mRNA en la regulación génica. **E)** La traducción de circRNAs es impulsada por N6-metiladenosina (m6A). **F)** Los circRNA con sitios de entrada ribosomal internos (IRESs) se pueden traducir. **G)** los EliciRNAs y ciRNAs promueven la transcripción. **H)** Los exo-circRNA son eliminados por el RES o excretados a través del hígado o los riñones. **I)** Exo-circRNAs regulan la inmunidad del cáncer. **J)** Exo-circRNAs promueven metástasis de cáncer. Adaptación (Z. Zhang et al., 2018).

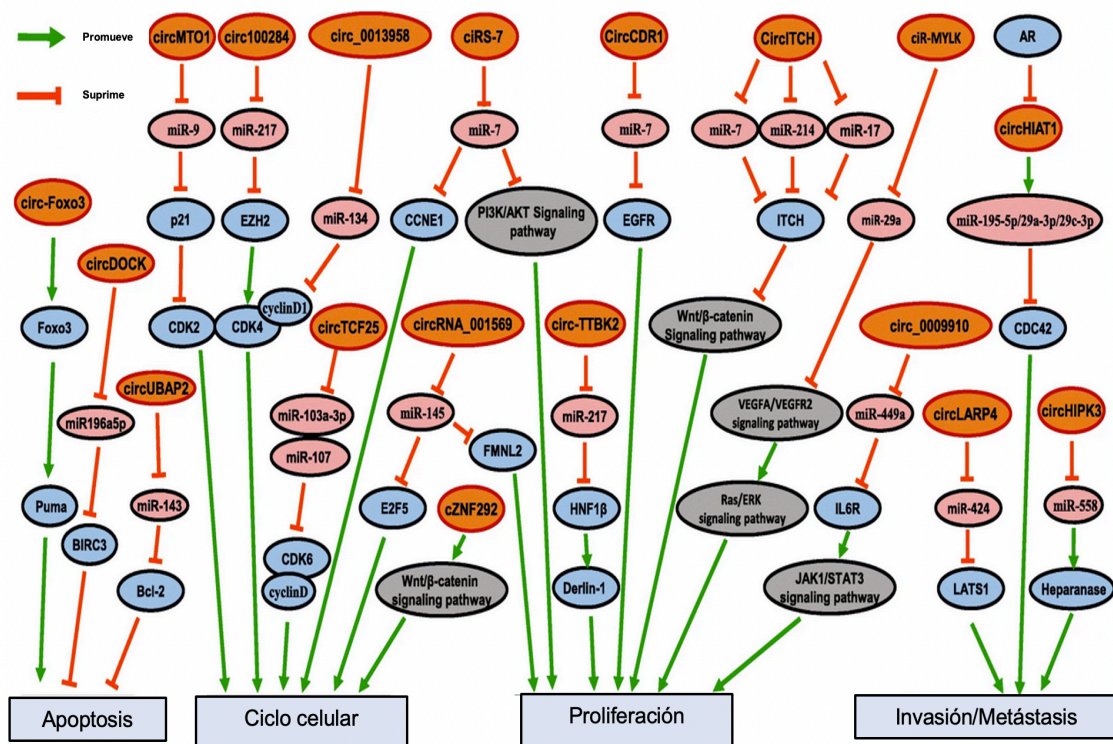
Asimismo, se ha descubierto que los circRNA son una nueva forma de lncRNA que se expresan abundantemente en el citoplasma, lo que supone un nuevo mecanismo de regulación en cáncer al estar implicados en la regulación de la traducción (M. Wang et al., 2017; S. Yang et al., 2018).

Los circRNA pueden detectarse fácilmente debido a su relativa estabilidad, expresión generalizada y abundante presencia en exosomas de sangre y saliva, lo que indica que los circRNA podrían ser nuevos e ideales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en el cáncer.



## 2.2.2 Implicación de los circRNA en cáncer

Cada vez hay más evidencias de que los circRNA están implicados en la regulación de las vías de señalización que influyen en la progresión y el desarrollo del cáncer, lo que hace que sean un posible objetivo terapéutico (Yin et al., 2018) (**Figura 12**). Los circRNA desregulados actúan como supresores de tumores u oncogenes al alterar funciones celulares, como la resistencia a la apoptosis, la regulación del ciclo celular, el mantenimiento de la señalización proliferativa y la migración e invasión celular (Z. Zhang et al., 2018).



**Figura 12.** Regulación de circRNAs en cáncer. CircRNA puede actuar como una esponja de miRNA o combinarse con proteínas para regular indirectamente la expresión génica en el cáncer. Circ-Foxo3, circDOCK y circUBAP2 están involucrados en la regulación de la apoptosis en el cáncer. CircMTO1, circ100284, hsa\_circ\_0013958 y circTCF25 pueden regular el ciclo celular a través de la regulación indirecta de las proteínas del ciclo celular en el cáncer. CiRS-7, circITCH, ciR-MYLK, circ-TTBK2 y circ\_0009910 están involucrados en la proliferación celular en parte a través de la vía PI3K/AKT, vía Wnt/β-catenina, vía VEGFA/VEGFR2 y JAK1/STAT3, respectivamente. CircHIAT1, circLARP4 y circHIPK3 están involucrados en la invasión o metástasis a través de la regulación indirecta de CDC42 y LATS1 en cáncer. Los diferentes colores indican diferentes tipos de moléculas: el naranja representa los circRNA, el rosa representa el miRNA, en azul el gen de codificación y el gris representa la vía de señalización. Adaptación (Z. Zhang et al., 2018).

### 2.2.3 Importancia clínica de los circRNA en cáncer

Los circRNA se pueden detectar no sólo en los tejidos tumorales, sino también en fluidos corporales como sangre, saliva y orina (Bahn et al., 2015). El enriquecimiento y la expresión anormal de los circRNA en fluidos corporales de pacientes con cáncer los convierten en candidatos ideales como biomarcadores a partir de biopsia líquida. Un estudio realizado por Yin et al. comparó los niveles de circRNA de plasma entre pacientes con cáncer de mama y donadores sanos, encontrando que los circ\_0001785 están regulados positivamente en el cáncer de mama (Yin et al., 2018).

Los circRNA también podrían ser usados como marcadores de pronóstico. Por ejemplo, un estudio sugiere que el RNA circular de la proteína quinasa C de tipo iota (circPRKCI) está desregulado en los tejidos de adenocarcinoma de pulmón, observándose que los pacientes con mayor expresión de circPRKCI tuvieron una peor supervivencia global, lo que sugiere que la presencia de circPRKCI podría ser un factor de mal pronóstico en pacientes con esta patología (Qiu et al., 2018).

La alta abundancia, la estabilidad, así como las firmas de expresión únicas y sus efectos en las vías de regulación asociadas con diversas enfermedades, resaltan el potencial de los circRNA como marcadores diagnósticos y pronósticos. Además, ciertos circRNA se han caracterizado como moléculas funcionales que contribuyen a la progresión del cáncer, convirtiéndolos en dianas terapéuticas prometedoras en cáncer de próstata (J. Li et al., 2020).

## 3 El Receptor de Andrógenos (AR)

El gen *AR*, también conocido como *NR3C4*, forma parte de una familia de receptores nucleares (NR) que actúan como factores de transcripción específicos; estos receptores se acoplan a elementos regulatorios en las regiones promotoras en respuesta a su unión a ligandos hidrofóbicos y desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica (Owen & Zelent, 2000; Pardee, 2004).

AR es un receptor nuclear de tipo I (receptores clásicos o esteroides), que incluye a los receptores de progesterona (PR), andrógenos (AR), el receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ), mineralocorticoides (MR) y el de glucocorticoides (GR). En humanos se han identificado 48 genes que codifican receptores nucleares, que están involucrados en casi todos los procesos fisiológicos y tienen un papel importante en la regulación del metabolismo, la diferenciación, el crecimiento y la homeostasis celular, así como la inflamación (Carlberg & Molnár, 2016).

El efecto de los glucocorticoides en el CaP es controvertido (Duma et al., 2006). Los glucocorticoides regulan diferentes efectos fisiológicos en prácticamente cada órgano del cuerpo y su efecto es mediado por el receptor de glucocorticoides. Existen dos isoformas del GR:  $GR\alpha$  y  $GR\beta$ , ambas producto del gen *NR3C1*, que consta de 9 exones. La expresión de ambas isoformas depende del *splicing* alternativo del exón 9 (N. Z. Lu & Cidlowski, 2005). Se ha visto que las terapias con glucocorticoides podrían promover el crecimiento tumoral debido a la similitud estructural con AR y GR, sus ligandos y la similitud de secuencia de sus elementos de respuesta. Además, dada la similitud en las secuencias, el GR puede sustituir a AR y activar sus genes diana, entre ellos el PSA, dependiendo del contexto celular y la expresión de cofactores, favoreciendo el crecimiento tumoral (Sahu et al., 2013).

El gen *AR* (*NR3C4*) se localiza en el cromosoma X, en la región q11-12. Su secuencia comprende 2757 nucleótidos y 8 exones, codificando una proteína de 110 kDa formada por 919 aminoácidos. Se expresa principalmente en los órganos reproductivos (próstata, ovario, endometrio), tejido adiposo, músculo esquelético, el hígado y el sistema nervioso central, pero no en la médula ósea (Rahman et al., 2004). El AR media las acciones fisiológicas de los andrógenos, los cuales están involucrados en la diferenciación sexual masculina, en el desarrollo y el mantenimiento de los tejidos reproductivos (Dalton & Gao, 2010).



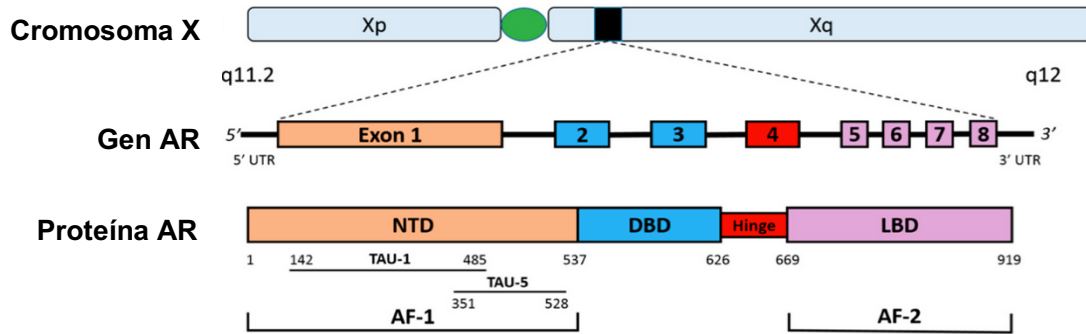
### 3.1 Estructura del AR

El AR está formado por dominios funcionales que permiten la dimerización del receptor, su unión al DNA y el complejo vía cofactores con la maquinaria basal de transcripción. Consta de cuatro dominios funcionales (**Figura 13**): el dominio de transactivación N-terminal (NTD); el dominio de unión al DNA (DBD); la región de la bisagra; y por último el dominio de unión a ligando (LBD) (Claessens et al., 2008).

El dominio NTD codificado por el exón 1, generalmente se considera constitutivamente activo, alberga la función de activación transcripcional 1 (AF-1) y es crítico para el complejo de transcripción celular. Dentro de AF-1 hay dos unidades de transactivación (TAU): TAU-1 (aminoácidos 142–485) y TAU-5 (aminoácidos 351–528). Entre los dos, TAU-5 es responsable de la mayoría de la actividad transcripcional constitutiva, y se ha asociado con la activación del AR aberrante en células CRPC.

El DBD está codificado por los exones 2 y 3, consta de dos dominios de dedos de zinc que coordinan la unión de la proteína AR a secuencias de DNA específicas y facilitan la homodimerización del receptor.

La región bisagra, codificada por el exón 4, separa el DBD del LBD y contiene la señal de translocación nuclear, que es necesaria para la importación nuclear del AR. El dominio LBD codificado por los exones 5-8, contiene el AF-2 y facilita la unión de los ligandos de andrógenos, que actúan como el mecanismo de control primario del eje de señalización del AR (Lonergan & Tindall, 2011).



**Figura 13.** Estructura del receptor de andrógenos. El AR está ubicado en el cromosoma X (Xq11-12) y está compuesto por ocho exones. El gen AR contiene el exón 1 que codifica para el NTD que contiene la función de activación de AF-1, los exones 2 y 3 corresponden al DBD. El exón 4 codifica la región bisagra, la cual representa una señal de localización nuclear y junto con los exones 5-8 componen al LBD en donde se encuentra la función de activación de AF-2. Dos unidades de transactivación principales están presentes en el AF-1: TAU-1 y TAU-5. Adaptación (Crona & Whang, 2017).

### 3.2 Mecanismos de acción del AR

#### a) Vía genómica

En ausencia de testosterona, el AR se encuentra principalmente en el citoplasma, formando un complejo con diversas proteínas, entre las cuales están las proteínas de choque térmico (HSPs) hsp90, hsp70 y hsp56, y con los microtúbulos del citoesqueleto (Smith & Toft, 2008). Las HSPs mantienen al receptor en una conformación óptima para su unión a ligando, por lo que son esenciales para una activación eficiente del receptor. La entrada de testosterona en la célula y su unión al receptor induce un cambio conformacional que rompe la unión con las HSPs. Esta disociación permite que queden expuestos los motivos de dimerización y se genere la señal de localización nuclear, permitiendo que el receptor sea translocado al núcleo (Gobinet et al., 2002).

En el núcleo, el receptor forma un homodímero que interactúa con secuencias cortas de DNA llamadas elementos de respuesta a andrógenos (ARE) que están localizadas en las regiones promotoras de sus genes diana, compuestas por secuencias palíndromas.

Algunos de los genes diana más conocidos son *PSA*, la proteasa transmembrana serina de tipo 2 (*TMPRSS2*), calicreína 2 (*KLK2*) y hexocinasa 2 (*HK2*). La unión a los ARE facilita el reclutamiento de histonas acetiltransferasas, demetilasas, quinasas y otros correguladores, así como la activación de la maquinaria de transcripción. La liberación del ligando permite que se vuelvan a exponer los sitios de exportación nuclear y que el receptor sea reciclado al citoplasma para unirse al citoesqueleto y prepararse para la unión con el siguiente ligando.

Las acciones genómicas del AR están ampliamente reguladas por su unión a los correguladores, las cuales pueden interactuar con el AR vía NTD y/o el dominio LBD. El reclutamiento de cofactores específicos está modulado por los cambios conformacionales del AR inducidos por su unión al ligando, así como por modificaciones post-traduccionales de los dominios del receptor (Dalton & Gao, 2010).

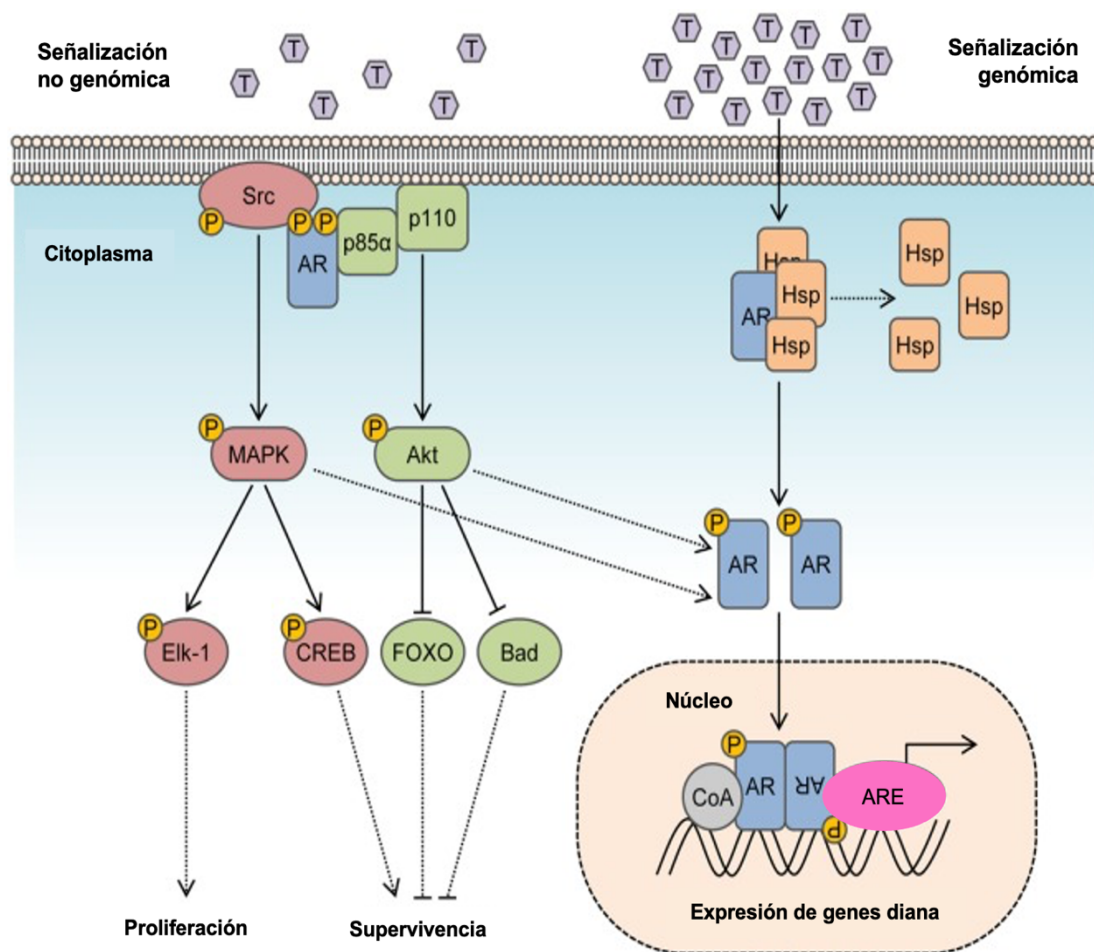
#### **b) Vía no genómica o independiente de ligando**

Diversas moléculas, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF) o citosinas como la interleucina 6 (IL-6), pueden activar a los receptores nucleares aún en ausencia de sus ligandos, pudiendo modificar su actividad (Simoncini & Genazzani, 2003).

Las vías no genómicas de señalización de testosterona son un grupo de vías que actúan de manera independiente de la transcripción génica o dependiente de ella mediante factores de transcripción distintos al AR o, en el caso de ser a través del AR, por transactivación del receptor y no por unión directa con el ligando (**Figura 14**).

Los mecanismos descritos para esta regulación positiva involucran el reclutamiento de coactivadores que funcionan como remodeladores de la cromatina e incrementan el posicionamiento de la maquinaria de transcripción basal, modulando así la transcripción de los genes diana aún en ausencia de hormonas. Asimismo, la fosforilación puede sensibilizar al AR a niveles bajos de andrógenos o a esteroides alternativos (Rochette-Egly, 2003).

Las células del cáncer de próstata muestran repuesta no genómica medida por el AR citoplasmático que facilita la activación de las cascadas de kinasas incluyendo Ras-Raf, PI3K/AKT y PKC, que convergen en las vías de las MAPK. Así, la activación de ERK puede fosforilar AR y sus coactivadores; además, la señal se puede activar independientemente de ERK por activación de mTOR. Estas observaciones son importantes porque indican que las estrategias dirigidas a evitar la vía genómica de activación de AR pueden no ser suficientes en el CaP (Liao et al., 2013).



**Figura 14.** Integración de la señalización no genómica y la señalización genómica del receptor de andrógenos. En presencia de niveles bajos de andrógenos, las interacciones del AR con la quinasa Src y la subunidad reguladora p85α de PI3K activan a MAPK y las rutas Akt para mejorar la proliferación celular y la supervivencia de una manera independiente de ligando. En presencia de altos niveles de andrógenos, el AR se activa en una vía canónica para regular la expresión de genes diana. La activación de MAPK y Akt por señalización no genómica también mejora las señales genómicas de AR al fosforilar los coactivadores transcripcionales en el núcleo. Adaptación (Leung & Sadar, 2017).

### 3.3 Importancia del AR en cáncer de próstata

El AR se expresa en la mayoría de los tumores de próstata y el crecimiento de estos tumores es, al menos inicialmente, dependiente de andrógenos (Rawla, 2019). El desarrollo de la próstata se inicia en el compartimiento estromal, que expresa el AR y produce factores paracrinos que regulan el crecimiento y diferenciación del epitelio prostático. En el CaP, el epitelio crece en respuesta a andrógenos, lo que sugiere que el desarrollo del cáncer es resultado de un mecanismo autocrino. La terapia de privación de andrógenos (ADT) continúa siendo el tratamiento de elección, con un 80-90% de remisión clínica (Vander Griend et al., 2010).

La ADT es un término empleado para referirse a la castración quirúrgica, la castración farmacológica a través de análogos de la hormona liberadora de LH (LHRH) que suprimen la secreción testicular de andrógenos, en combinación con antiandrógenos (bicalutamida) que se unen al AR e inhiben su actividad transcripcional (Vis & Schröder, 2009). Estos tipos de terapia son los tratamientos sistémicos estándar para el CaP localmente avanzado, en recaída o metastásico (Dehm & Tindall, 2011).

Inicialmente, estas terapias pueden inhibir eficazmente la actividad transcripcional del AR en las células de CaP, lo que conduce a una expresión reducida de genes diana de AR como el *PSA* y la regresión tumoral. Sin embargo, eventualmente se producen cambios en la biología de los tumores durante la ADT que permiten la reanudación del crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. Esta etapa de la enfermedad es denominada CRPC y, es una causa importante de morbilidad y mortalidad por CaP (Dehm & Tindall, 2011).

Los estudios sobre los mecanismos de progresión del CaP durante la ADT han demostrado que, en casi todos los casos, la reanudación de la actividad transcripcional del AR es un evento crítico (Knudsen & Scher 2009); por lo tanto, como parece ser el caso con otras terapias dirigidas contra el cáncer, la

resistencia del CaP a ADT generalmente ocurre a través de cambios en la diana del fármaco.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo el AR puede estimular la proliferación celular en un medio deplecionado a andrógenos, como la amplificación o mutación del AR, alteraciones en los niveles de cofactores o activación de otras rutas de señalización que no utilizan andrógenos para la activación del receptor (Agoulnik & Weigel, 2006).

### **3.4 Mecanismos moleculares implicados en la activación del AR**

Los mecanismos de resistencia a fármacos en el CaP se deben principalmente a que la señalización del AR se mantiene activa aún en niveles bajos de andrógenos circulantes. Los mecanismos moleculares implicados en la reactivación del AR son complejos y heterogéneos, algunos de ellos son: la amplificación y sobreexpresión de AR, mutaciones puntuales, variantes de procesamiento de AR constitutivamente activas y la biosíntesis de andrógenos intratumoral alterada (Jentzmik et al., 2016).

#### **Amplificación y sobreexpresión del AR**

La amplificación del número de copias del AR permite explicar la progresión del fenotipo CRPC en un 20-30% de los pacientes y, probablemente, es importante para el desarrollo de la resistencia al tratamiento. La sobreexpresión del receptor se presenta también en tumores sin amplificación génica, debido a un aumento en la tasa de la transcripción del gen del *AR* y a un incremento en la estabilidad de la proteína como consecuencia de modificaciones post-traduccionales (Datta & Tindall, 2013).

Se han identificado proteínas que promueven la estabilización del AR, entre ellas el transductor de señales y activador de la transcripción 5 (Stat5), las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) 1 y 5, además de proteínas de unión a RNA como proteinasa de cisteína 1 (CP1) y proteinasa de cisteína 2 (CP2) que se unen al mRNA del AR y afectan su estabilidad (Thomas et al., 2011).

### **Mutaciones puntuales del AR**

En CRPC, las mutaciones del AR se encuentran en un 5-30% de los tumores, (Coutinho et al., 2016). La mayoría de las mutaciones somáticas puntuales clínicamente relevantes se encuentran en el dominio LBD. Una de las mutaciones puntuales más frecuentes del gen *AR* es T878A (previamente denominada T877A), que es una mutación de ganancia de función y puede activarse tanto por las hormonas esteroideas como por antiandrógenos de primera generación como la bicalutamida o flutamida. Esta mutación amplía la especificidad de unión al ligando del AR para que pueda ser activada por progesterona, glucocorticoides y estrógeno (Boudadi & Antonarakis, 2016); por lo tanto, la mutación crea clones malignos que pueden superar la inhibición de la abiraterona.

Los estudios sobre las mutaciones en el AR sugieren que estas proveen una ventaja de supervivencia a las células de cáncer de próstata y promueven la resistencia a anti-andrógenos (Crona & Whang, 2017).

Los estudios sobre los posibles mecanismos de producción de andrógenos intratumorales y las diversas formas de activación del AR han llevado al desarrollo de fármacos (abiraterona-MDV3100) como nuevas terapias en hombres con CRPC (Attard et al., 2009; Tran et al., 2009). El estudio de posibles mecanismos responsables del cáncer de próstata independiente de andrógenos es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

### **3.5 Las variantes del AR**

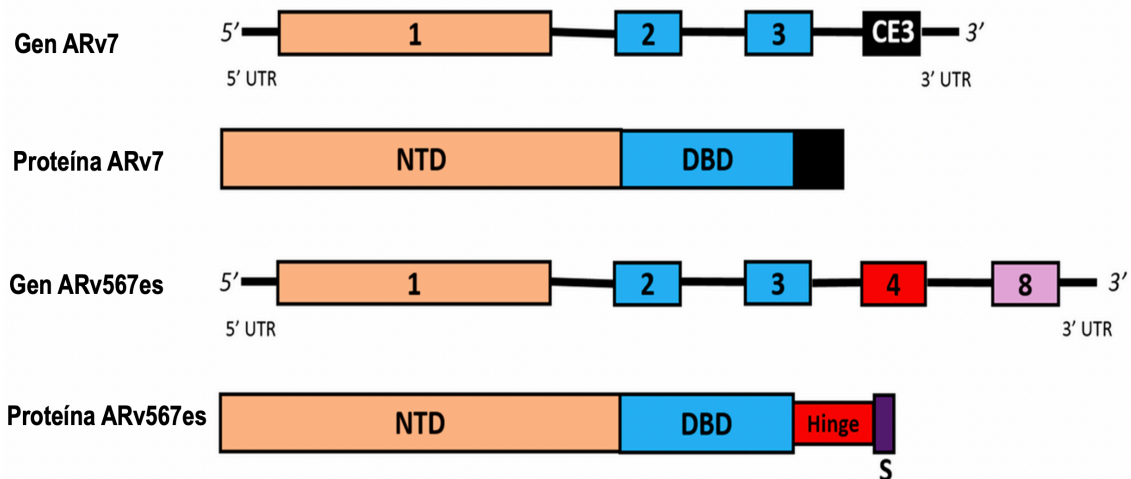
Se han identificado aproximadamente 20 variantes de procesamiento del mRNA de AR (AR-V) desde 2008. Estas variantes se han clasificado en función de su actividad transcripcional en tres grupos diferentes: las que son constitutivamente activas, que incluyen a las variantes 7 (ARv7 o AR3) y 567 (ARv567es o AR-12); los condicionalmente activos, como las variantes ARv1 y ARv9, y las variantes inactivas como ARv13 y ARv14 (Zhu & Luo, 2020). La mayoría de estas AR-V tienen un dominio de transactivación N-terminal intacto y un dominio de unión al DNA, seguido de un péptido corto específico de la variante que reemplaza al dominio LBD C-terminal (Antonarakis et al., 2014).



Las variantes de procesamiento del AR en las células tumorales del cáncer de próstata se han asociado con el desarrollo de resistencia a la ADT, siendo ARv7 y ARv567 los más estudiados y clínicamente significativos (Ware et al., 2014).

ARv7 es una variante con un exón críptico 3 en lugar de los exones 4-8, este empalme alternativo conduce a una proteína que ha perdido la región bisagra y el dominio LBD. Por otro lado, ARv567 es una variante que contiene secuencias de los exones 1-4 y del exón 8; sin embargo, carece de los exones 5, 6 y 7; la combinación de exón 1/2/3/4/8 desplaza el marco de lectura abierto (ORF) de esta variante a un codón de parada prematuro justo después de los primeros 29 nucleótidos en el exón 8. Estas variantes son independientes de andrógenos y codifican proteínas que pueden unirse al DNA para promover la transcripción de genes diana.

El receptor de andrógenos de longitud completa (AR-FL) y las principales estructuras de variantes de empalme se representan en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Variantes de empalme clínicamente relevantes. Esta figura representa las estructuras de genes y proteínas para las variantes de empalme ARv7 y ARv567es. Abreviaturas: ARv567es, variante de empalme del receptor de andrógenos con los exones 5–7 omitidos; AR-V7, variante de empalme del receptor de andrógenos V7; CE3, exón críptico 3; NTD, dominio de transactivación de N-terminal; S, codón de parada prematuro; UTR, región no traducida. Adaptación (Crona & Whang, 2017)

### Variante 7 del receptor de andrógenos (ARv7)



La variante ARv7 se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad después de la prostatectomía radical, con un aumento de la transición epitelio-mesénquima que contribuye a la diseminación metastásica y con mal pronóstico en el CaP metastásico. Esta variante se puede expresar en tejidos de próstata benignos y malignos, y participa en el desarrollo de resistencia a los tratamientos anti-andrógenos que conducen a un estado de resistencia a la castración (Mollica et al., 2019).

Diversos estudios sugieren que la expresión de ARv7 es específica en CRPC (Hu et al., 2009), regulada negativamente por la señalización mediada por el AR-FL que coexiste en la misma célula (Bitting et al., 2014; Watson et al., 2015) y puede conducir a un fenotipo agresivo cuando se suprime la señalización del AR en la vía genómica (Robinson et al., 2015). Aunque ARv7 y AR-FL comparten sitios de unión de cromatina comunes, ARv7 también muestra sitios de unión distintos al interactuar con diferentes correguladores/represores.

Se han encontrado datos insuficientes sobre el mRNA de ARv7 y la expresión de su proteína en CaP primario, aunque algunos estudios sugieren que se expresa. La expresión de la proteína ARv7 aumenta a medida que los pacientes desarrollan CRPC y resistencia a enzalutamida o acetato de abiraterona (Fizazi et al., 2014). La proteína tiene un motivo de secuencia de localización nuclear que se expone a través de cambios conformacionales tras la unión de andrógenos, lo que permite la translocación nuclear necesaria para la unión del DNA. La expresión nuclear de ARv7 es heterogénea en diferentes metástasis de CRPC en el mismo paciente y puede asociarse con una firma genética única en pacientes con CRPC (Sharp et al., 2019).

Se ha sugerido que la expresión de la proteína ARv7 es más frecuente en las biopsias de CRPC que lo que se informó previamente en los estudios de mRNA de ARv7 y de expresión de proteínas en biopsias líquidas (11-46%) (Sharp et al., 2019). Las biopsias de pacientes resistentes a la castración que muestran metástasis en los ganglios linfáticos expresan niveles más altos de ARv7 que otras localizaciones, lo que puede explicar la menor incidencia de ARv7 detectada en biopsias líquidas (De Laere et al., 2017).

### **Variante ARv567 del receptor de andrógenos**

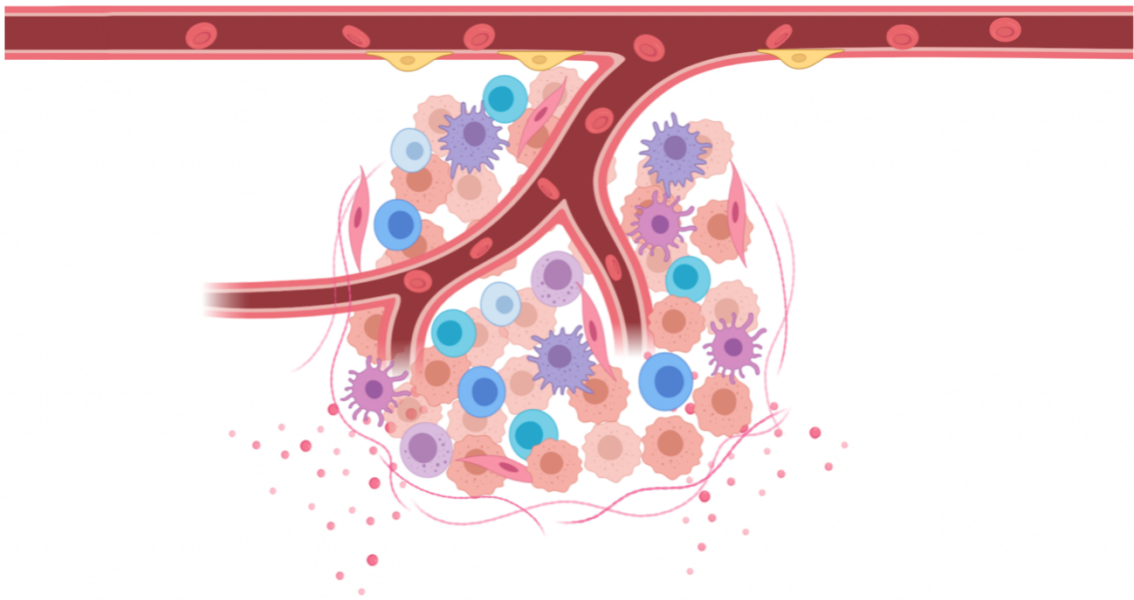
ARv567 es la única variante que conserva el dominio bisagra completo, codificado por parte de los exones 3 y 4; este dominio contiene secuencias importantes para la localización y actividad del AR.

ARv567 activa genes que responden a los andrógenos (como *KLK3*, *TMPRSS2* y *NKX3.1*) de manera independiente de las hormonas cuando se expresa ectópicamente en la línea celular LNCaP (C. Lu & Luo, 2013). La secuencia de ARv567 es idéntica a ARv12 y contiene los exones 1/2/3/4/8/9 (Hu et al., 2009). Esta variante, al igual que ARv7, se puede expresar en tejidos de próstata benignos y malignos; sin embargo, sus niveles aumentan durante la ADT creando un estado de resistencia a la castración (Wadosky & Koochekpour, 2017).

Mientras que ARv7 es independiente de los microtúbulos y las células que lo expresan muestran una resistencia relativa a los taxanos, ARv567 presenta una disminución de la afinidad por los microtúbulos a pesar de la presencia del dominio bisagra (Thadani-Mulero et al., 2014). Estudios previos en pacientes con CRPC no han mostrado una asociación significativa entre la expresión de ARv7 y la respuesta a la quimioterapia con taxanos, mientras que el impacto de ARv567 no ha sido evaluado (Tagawa et al., 2019).



# Hipótesis y Objetivos





## Justificación

El cáncer de próstata representa alrededor del 12% de los casos de cáncer de nuevo diagnóstico en Europa. Es uno de los tumores más prevalentes en España y uno de los más frecuentemente diagnosticados en el mundo (Ferlay et al., 2010). El carcinoma de próstata es el cáncer no cutáneo más común que reduce la calidad de vida y es causante de muertes prematuras entre hombres a nivel mundial (Ilic et al., 2013).

Los biomarcadores de origen tumoral, como las células tumorales circulantes, los ácidos nucleicos específicos de tumor, las proteínas, etc., pueden ser detectados a través de la biopsia líquida, basada en la toma de una muestra de sangre periférica, que proporciona un medio para el diagnóstico mínimamente invasivo, superando las limitaciones de la adquisición de la muestra de tejido tumoral, ya que muchas veces no es posible la obtención de la muestra o puede presentar un riesgo demasiado alto para el paciente (Yu et al., 2012). Estudios recientes sugieren que tanto las plaquetas educadas por el tumor, como una de los RNAs no codificantes, los circRNA, pueden estar implicados en la regulación del CaP.

En los pacientes con CaP, la causa principal a la progresión de la enfermedad y la resistencia a la castración es la alteración genética en el gen *AR* o en sus variantes clínicamente significativas como *ARv7* y *ARv567* que son constitutivamente activas y se asocian con peor pronóstico.

La detección precoz, diagnóstico clínico y monitorización del cáncer se consideran aplicaciones importantes de las biopsias líquidas, ya que pueden permitir un diagnóstico más temprano, mejorar la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad (Alix-Panabières & Pantel, 2014).

## **Hipótesis**

El uso de biopsia líquida a partir de sangre periférica es una herramienta potencial no invasiva para detectar biomarcadores que permitan diagnosticar y monitorizar pacientes con CaP.

## **Objetivos**

Por todo ello en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudio del gen *AR* y sus variantes en sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*”.
2. Estudio del gen *AR* y sus variantes en plaquetas circulantes de pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*”.
3. Estudio de circAR en sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*”.
4. Estudio genómico mediante aCGH y NGS de cáncer de próstata en tejido tumoral.





# Pacientes y Métodos





## 1. Pacientes

En este estudio se han incluido 42 pacientes diagnosticados de cáncer de próstata metastásico *de novo*, sin tratamiento en el momento de la toma de muestra, en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca entre los años 2015 y 2019. Como grupo control para los estudios genéticos se utilizaron muestras de 16 varones menores de 35 años sin historial clínico de enfermedades de la próstata. En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre periférica bajo consentimiento informado.

Los datos clínicos de los pacientes: edad, plaquetas, PSA, índice de gleason y el tipo de metástasis (M1a, M1b y M1c), se obtuvieron en el Servicio de Urología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca a partir de una base de datos anonimizada (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Resumen de las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Características clínicas		Total n= 42
Edad (SD, rango)		75 (10,13; 50-91)
Plaquetas (SD)		274,45 (113,42)
PSA (SD, rango)		351,46 (528,34; 0,003-2215)
Índice de Gleason	7	5 (11,90)
	>8	28 (66,67)
	ND	9 (21,43)
Tipo de Metástasis	M1a	2 (4,76)
	M1b	34 (80,95)
	M1c	3 (7,14)
	ND	3 (7,14)
Metástasis a distancia	Hueso	25 (59,52)
	Ganglios	3 (7,14)
	Visceral	4 (9,52)
	ND	10 (23,81)
Status	Vivo	20 (47,62)
	Exitus	22 (52,38)

SD: Desviación estándar, ND: No dato.

El análisis de anomalías mediante microarray genómico y NGS se realizó en 8 muestras de tejido tumoral en bloques FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) procedentes de pacientes anonimizados con cáncer de próstata recolectadas entre los años 2015 y 2019 por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, las características clínicas de los pacientes se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Características de los tumores estudiados por microarrays genómicos.

Nº de muestra	Grupo de Riesgo	Edad	PSA ng/ml	Índice de Gleason	Status Paciente
40358	Mtx <i>de novo</i>	84	1374	8	Exitus
40365	Mtx <i>de novo</i>	63	198,3	10	Vivo
40361	Mtx <i>de novo</i>	56	319,1	10	Vivo
40352	CRPC	53	4,93	8	Vivo
40354	CRPC	76	8,17	8	Vivo
40373	Alto Riesgo	49	26,7	8	Vivo
40369	Bajo Riesgo	49	5,51	6	Vivo
40367	Bajo Riesgo	44	9,15	6	Vivo

Mtx: metastásico, CRPC: cáncer de próstata resistente a la castración

### Criterios de inclusión

Pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásicos *de novo* y que otorguen su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

### Criterios de exclusión

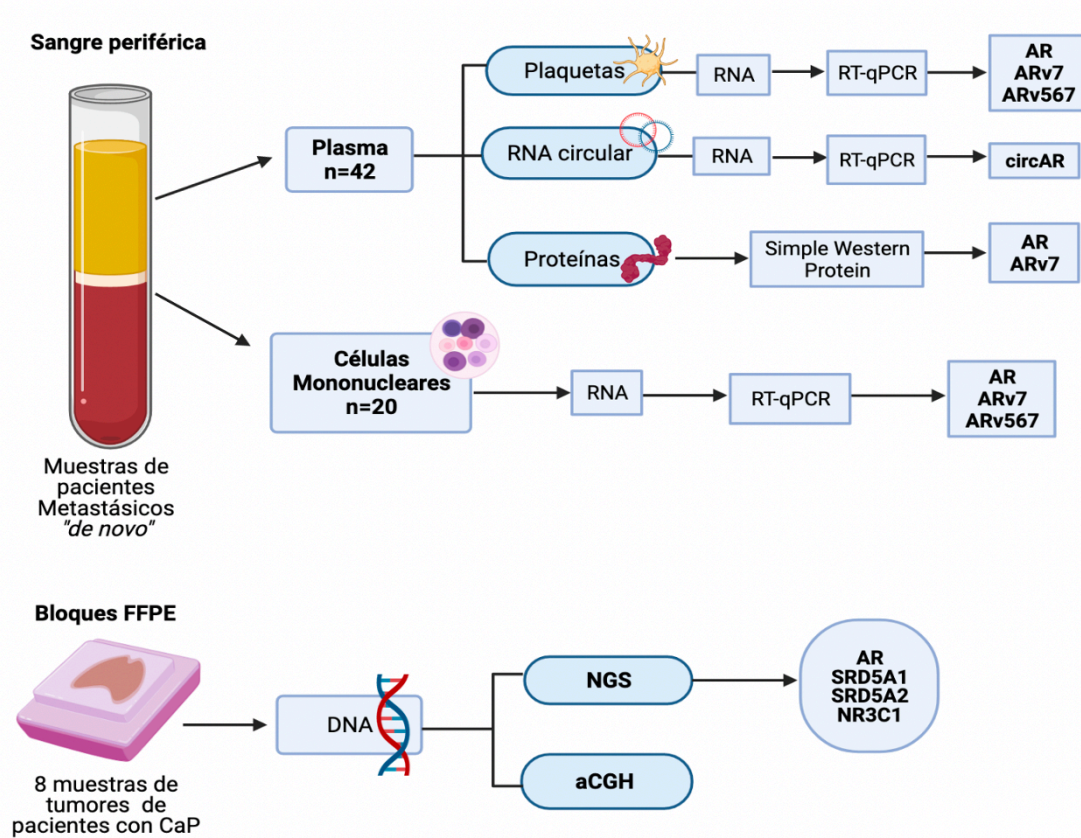
Pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásicos no *de novo*, resistentes a la castración o que sean catalogados dentro de algún grupo de riesgo (bajo, intermedio, alto) o que no otorguen su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

### Aspectos éticos

Los datos personales de los pacientes incluidos en el estudio han sido archivados y custodiados por los investigadores, únicamente se han utilizado para fines relacionados con este estudio.

El estudio obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, referencia CEIm: **PI 2021 03 714**.

## Esquema general de trabajo



**Figura 16.** Esquema General de Trabajo empleado en este estudio.

## 2. Métodos

### 2.1 Cultivos celulares

En este trabajo hemos utilizado tres líneas celulares derivadas de cáncer de próstata como control positivo en los estudios genéticos y cuyas características de detallan en la **Tabla 6**.

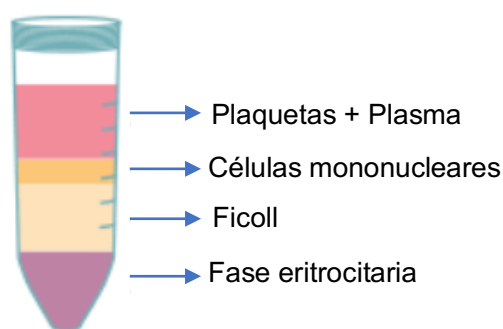
**Tabla 6.** Características de las líneas celulares de cáncer de próstata.

Línea celular	Tipo tumoral	Edad	Genes sobre expresados
VCaP	Metástasis vertebral	59 años	p53+ AR+ ARv7+ PSA+ PAP+
LNCaP	Carcinoma Metástasis en ganglio linfático supraclavicular izquierdo	50 años	AR+ ARv567es+ ER+ PSA+
PC3	Adenocarcinoma grado IV Metástasis en hueso	62 años	AR- EGF-R+ TGF- $\alpha$ +

Las líneas celulares se cultivaron en un incubador (Cultek S.L.U., Madrid, España) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para el cultivo de VCaP se utilizó el medio DMEM y para las líneas celulares de LNCaP y PC3 se utilizó el medio RPMI con glucosa (4.5 g/l), L-glutamina y L-piruvato. El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomicina) (*Invitrogen, Life Technologies, California, Estados Unidos*).

## 2.2 Obtención de células mononucleadas y plasma

A partir de 10 mL de sangre periférica con EDTA se aislaron las células mononucleares, plaquetas y plasma de pacientes con CaP metastásico *de novo* y donadores sanos. Las muestras fueron procesadas mediante el método de centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Hystopaque (Lymphoprep), relación 3:2 (Ficoll/Sangre) a 2,500 rpm durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugado en el tubo distinguimos tres fases: la fase superior que contiene el plasma y plaquetas, la interfase que presenta un aspecto blanquecino que contiene las células nucleadas y la fase inferior o fase eritrocitaria (**Figura 17**).



**Figura 17.** Representación del gradiente de densidad en sangre periférica por el método de ficoll. Adaptación (Leukocyte Preparation Protocol: R&D Systems, n.d.).

### 2.3 Aislamiento de plaquetas

El plasma previamente obtenido, se centrifugó 10 min a 1,300 rpm a temperatura ambiente para eliminar restos celulares y se recogió el plasma rico en plaquetas (PRP) en un tubo nuevo. Se centrifugó nuevamente 20 min a 1,000 rpm para obtener el pellet plaquetario y se prosiguió a la extracción de RNA (Dhurat & Sukesh, 2014).

## 3. Estudios con RNA

### 3.1 Aislamiento de RNA a partir de células mononucleares

A las células mononucleadas se les añadió 500  $\mu$ l de TRizol (Life Technologies) y se incubaron durante 3 min. Posteriormente, se añadió 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó por inversión y se incubó nuevamente por 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual la muestra se centrifugó a 9,000 rpm por 15 min a 4°C, obteniendo tres fases: la fase inferior que contiene restos de proteínas y TRizol, la fase intermedia que contiene el DNA, y la fase acuosa u orgánica que contiene el RNA.

Se recogió la fase acuosa, se transfirió a un tubo eppendorf y se añadió 500  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se almacenó a -80°C toda la noche para precipitar el RNA.

A continuación, se descongelaron los tubos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después, se eliminó el sobrenadante por pipeteo y se observó el *pellet* de RNA. El *pellet* se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, seguido se eliminó el sobrenadante nuevamente por pipeteo y se dejó secar al aire aproximadamente de 5 hrs. Se resuspendió el *pellet* en 40  $\mu$ l agua libre de RNAsas.

### **3.2 Aislamiento de RNA a partir de líneas celulares**

El aislamiento de RNA se realizó a partir de una placa de 10mL, se aspiró el medio y se lavó con PBS. Se añadió 1mL de TRizol (Life Technologies), se resuspendió bien para recoger todas las células y se transfirió a tubos nuevos manteniéndolos en hielo. El protocolo que siguió fue el previamente descrito en el apartado anterior.

### **3.3 Aislamiento de RNA a partir de plaquetas**

Para la extracción de RNA, se resuspendió el *pellet* de plaquetas en 600  $\mu$ l de buffer de lisis RLT de RNeasy mini kit (QIAGEN) y se siguió el procedimiento especificado por el fabricante. Se mezcló vigorosamente con tal de disgregar el *pellet* por completo, el lisado se transfirió a la columna RNeasy y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos.

Después de centrifugado, se conservó lo eluido y se mezcló con 600  $\mu$ l de etanol al 70%, la mezcla se transfirió a la misma columna RNeasy y se centrifugó a 8,000 x g por 1 minuto. Se lavó la columna con 700  $\mu$ l de buffer RW1, seguido de dos lavados con 500  $\mu$ l de buffer RPE a 8,000 x g por 1 min. Se eliminó lo eluido y se centrifugó la columna a máxima velocidad por 2 minutos para eliminar exceso de buffer RPE. Seguido, se transfirió la columna a un tubo nuevo y se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua libre de RNAsas.



### 3.4 Cuantificación del RNA

La concentración de RNA de las muestras se determinó en un espectrofotómetro *NanoDrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific) midiendo la absorbancia de la muestra. El cociente entre las absorbancias A260/A280 permitió determinar la pureza de las muestras, comprendiendo valores entre 2.0-1.8. Las muestras que se encontraran con valores inferiores a los señalados anteriormente se procedió a una purificación, para eliminar contaminación por etanol.

Todas las muestras de RNA se almacenaron a -80°C para evitar su degradación.

### 3.5 Purificación de RNA

Para eliminar la contaminación en las muestras de RNA, se purificó empleando el kit RNeasy PowerClean® Pro Cleanup (Qiagen), a partir del RNA extraído se ajustó hasta un volumen de 100 µl con agua, se añadió 50 µl de solución CU y solución IR respectivamente, se mezcló por vórtex y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos.

Sin tocar el pellet, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadió 200 µl de solución SB y etanol absoluto, la mezcla se transfirió a la columna MB-RNA y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto.

Se le realizaron dos lavados a la columna añadiendo 500 µl de solución RW y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Posteriormente, se transfirió la columna a un tubo nuevo y se añadió 40 µl de agua libre de RNasas.

### 3.6 RT-PCR

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se usó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). La RT es una técnica que permite sintetizar cDNA a partir de un RNA de cadena simple usando para ello la enzima transcriptasa reversa, el cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA.

Para la cual se utilizó un máximo 2µg de RNA previamente extraído en un volumen 10 µl. La composición de la mezcla de reacción se preparó en hielo adicionando 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl de RNase Inhibitor y 3,2 µl de H<sub>2</sub>O, obteniendo un volumen final de mezcla de 20 µl.

La reacción de síntesis se llevo a cabo en un termociclador utilizando el programa como se muestra en la **Tabla 7**:

**Tabla 7.** Condiciones para la RT-PCR.

Condiciones	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

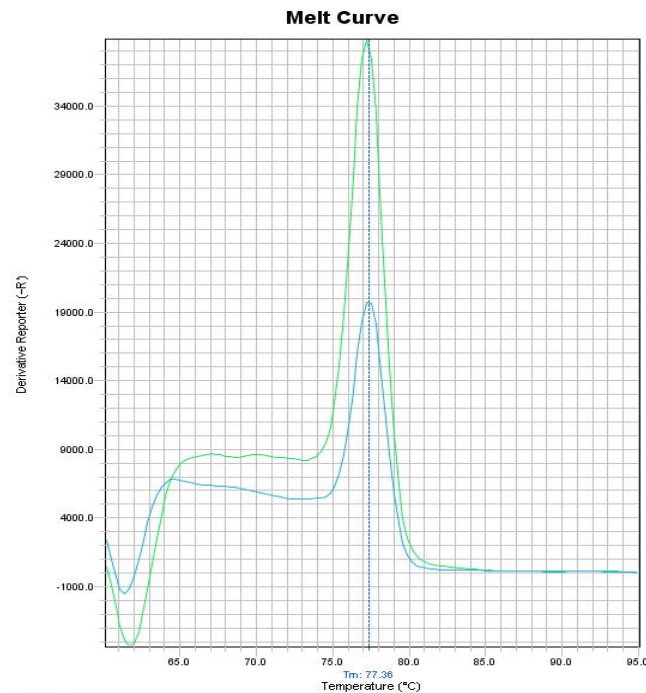
Posteriormente los tubos de reacción se almacenaron a -20°C hasta su uso o cuantificación en el *Nanodrop* para la amplificación del DNA mediante qPCR.

### 3.7 PCR cuantitativa-comparativa a tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Para la amplificación del DNA se emplea un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado, así como un *Hardware* y un *Software* para la captura y el análisis de los datos, respectivamente.

El Ct, del inglés *cycle threshold*, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia y es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del DNA molde.

La qPCR permite, empleando un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de DNA (generalmente SYBR Green) identificar fragmentos amplificados de DNA concretos a partir de la temperatura de fusión (también denominado valor  $T_m$  (*melting temperature*), específica para el fragmento amplificado que se está buscando. La derivada de la curva revela un pico máximo que corresponde a esa temperatura de fusión como se muestra en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Gráfica de la curva de fusión del producto de amplificación

Comparando el Ct del fragmento de referencia con el Ct del fragmento problema en la muestra de los pacientes y en las líneas celulares usadas como controles, se pueden determinar las amplificaciones en el gen de interés. Para el ensayo de cuantificación de la qPCR se utilizó el método de expresión relativa de  $\Delta Ct$ , este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre un gen de interés vs un gen endógeno.

### 3.8 Estudio de la expresión de las variantes de AR en células mononucleares

El análisis de los niveles de expresión de las variantes del AR se llevó a cabo en un total de 20 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico *de novo* a partir de RNA de células mononucleares. No se pudo realizar el estudio en las otras 22 muestras que previamente se habían incluido en el estudio por falta de material genómico.

El estudio mediante RT-qPCR requiere la amplificación del fragmento correspondiente a la secuencia de interés comparado con el fragmento de referencia que, en nuestro trabajo, corresponde a un fragmento del gen *GAPDH*. Además, fue necesario utilizar un control (la línea celular VCaP que expresa *AR* y sus variantes) que se amplificó en condiciones iguales que las muestras de los pacientes.

**Tabla 8.** Primers utilizados para la amplificación de las variantes del receptor de andrógenos.

<b>Gen</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
<b><i>GAPDH</i></b>	5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
<b><i>AR</i></b>	5'-CATCAAGGAACTCGATCGT-3'	5'-GAACTGATGCAGCTCTCTC-3'
<b><i>ARv7</i></b>	5'-CTGTGCGCCAGCAGAAAAT-3'	5'-TCAGGGTCTGGTCATTTTGA-3'
<b><i>ARv567</i></b>	5'-CTTGCAGCCTTGCTCTCTA-3'	5'-CTTGCCTGATTGCGAGAGAG-3'

Con el fin de obtener la misma cantidad de DNA inicial en todas las muestras, se cuantificó la concentración en el *Nanodrop* y posteriormente, se realizaron las diluciones pertinentes con la finalidad de dejar todas las muestras de DNA a una concentración de 100 ng/μl.

Las PCRs se prepararon en placas ópticas de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0.1 mL (*Life Technologies-Invitrogen*, California, U.S.A.).

Por cada muestra a analizar, se llevaron a cabo dos reacciones diferentes: una reacción de amplificación del fragmento de interés y una reacción del fragmento de referencia del gen *GAPDH*, todas las muestras se realizaron por triplicado.

El equipo empleado para llevar a cabo la PCR a tiempo real fue StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.). El programa utilizado para analizar los resultados fue el StepOne software 2.1 (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.).

La reacción de amplificación para todas las muestras se preparó en un volumen de 11  $\mu$ l por pocillo con las siguientes condiciones: 5  $\mu$ l de SYBR® Green PCR Máster Mix, 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 1  $\mu$ l de los primers y 1  $\mu$ l de la dilución de cDNA a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l. Para asegurar la ausencia de contaminación en las muestras, se incluyeron controles negativos según el gen de estudio respectivamente.

El programa de amplificación utilizado para la obtención de las curvas de fusión se expone en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Representación del programa de amplificación de los genes incluidos en el estudio.

Etapa	Temperatura		Tiempo
1	95°C		10 min
2	95°C		15 seg
3	<i>GAPDH</i>	60 °C	1 min
	<i>AR</i>	56 °C	
	<i>ARv7</i>	56 °C	
	<i>ARv567</i>	60 °C	
4	72°C		10 min
5	-		Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 40 ciclos
6	Melt curve		

### 3.9 Estudio de la expresión de AR y sus variantes en plaquetas circulantes

El análisis de los niveles de expresión de las variantes del AR se llevó a cabo en un total de 16 donadores sanos y en 42 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico *de novo* a partir de RNA de plaquetas circulantes. El estudio mediante RT-qPCR utilizamos las mismas condiciones que en el apartado 3.8 previamente descrito. Además, utilizamos como control interno el gen *ITGA2B* como marcador plaquetario.

**Tabla 10.** Primers utilizados para la amplificación de las variantes del receptor de andrógenos.

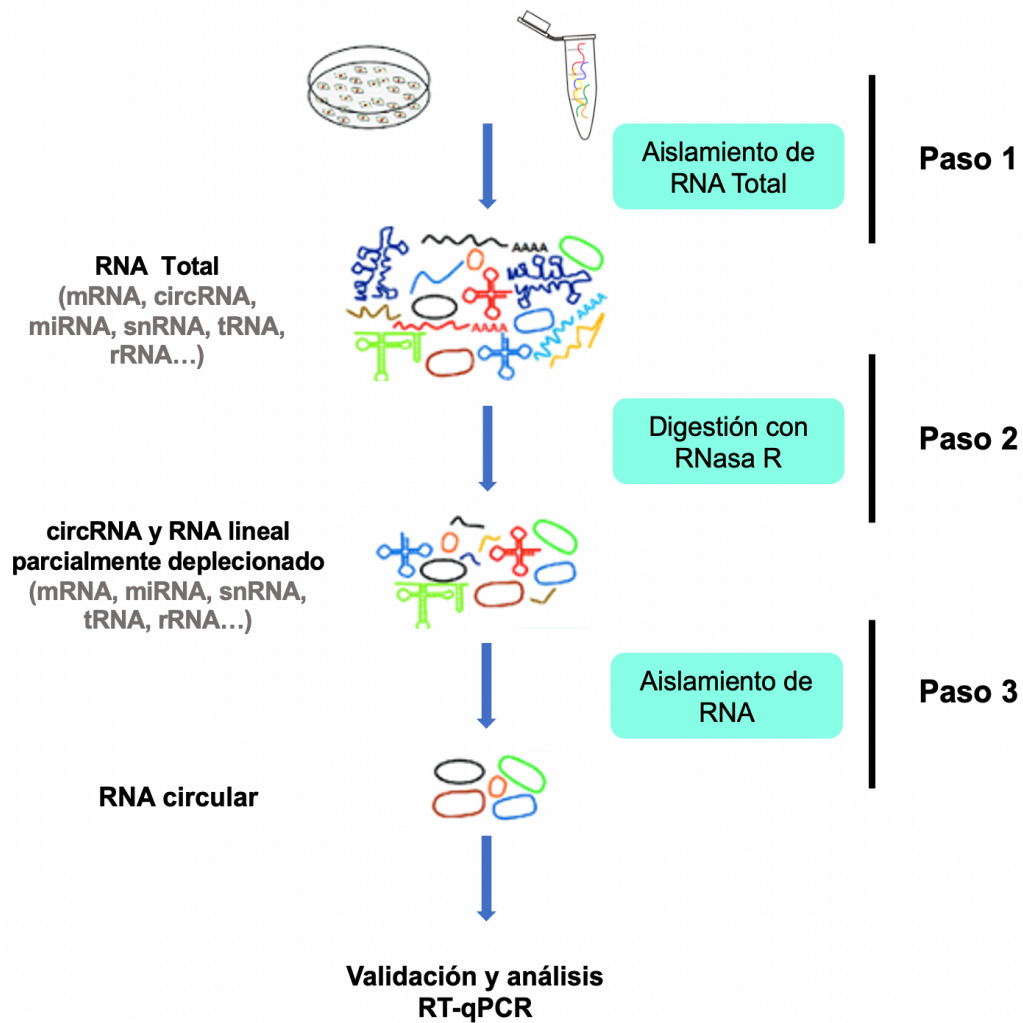
<b>Gen</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
<b>GAPDH</b>	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
<b>ITGA2B</b>	5'-TTCAGTGGACTTCCACAAGG-3'	5'-ACACGTGCCACAAAAGGATG-3'
<b>AR</b>	5'-CATCAAGGAACTCGATCGT-3'	5'-GAACTGATGCAGCTCTCTC-3'
<b>ARv7</b>	5'-CTGTGCGCCAGCAGAAAT-3'	5'-TCAGGGTCTGGTCATTTTGA-3'
<b>ARv567</b>	5'-CTTTGCAGCCTTGCTCTCTA-3'	5'-CTTGCCTGATTGCGAGAGAG-3'

Con el fin de obtener la misma cantidad de DNA inicial en todas las muestras, se cuantificó la concentración en el *Nanodrop* y posteriormente, se realizaron las diluciones pertinentes con la finalidad de dejar todas las muestras de DNA a una concentración de 100 ng/μl. Por cada muestra a analizar, se llevaron a cabo dos reacciones diferentes: una reacción de amplificación del fragmento de interés y una reacción del fragmento de referencia del gen *GAPDH*, todas las muestras se realizaron por triplicado.

## 4. Estudio del circAR en sangre periférica

### 4.1 Obtención de RNA circular a partir de plasma y líneas celulares

Para el aislamiento de circAR en pacientes, donadores sanos y líneas celulares se utilizó el siguiente esquema de trabajo que se divide en tres pasos y se muestra en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Esquema representativo de los pasos a seguir para el aislamiento de RNA circular. Adaptación (Pandey et al., 2019).

#### 4.1.1 Extracción de RNA Total en plasma

Para la extracción de RNA de plasma de pacientes y donador sano, se utilizó el kit miRNeasy Suero/Plasma (Cat #217184, Qiagen, Helden, Germany). Partiendo de 200  $\mu$ l de plasma se añadió 1mL de QIAzol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguido, se añadió 200  $\mu$ l de cloroformo, se incubó nuevamente y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos.

Se separó la fase acuosa que contiene el RNA en un tubo nuevo y se añadió 800  $\mu$ l de etanol absoluto. Se mezcló por pipeteo y se transfirió la muestra a la columna RNeasy MinElute y, se centrifugó a 8,000 x g >1 min a temperatura ambiente. Se lavó la columna con 700  $\mu$ l de buffer RWT centrifugando a 8,000 x g >1 min y eliminado lo eluido. Se realizó un segundo lavado con 500  $\mu$ l de buffer RPE, seguido de un último lavado con 500  $\mu$ l de etanol fresco al 80% y se centrifugó a 8,000 x g por 2 minutos. Para secar la membrana y eliminar el resto de etanol se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se añadió 24  $\mu$ l de agua libre de RNasas.

#### 4.1.2 Extracción de RNA total a partir de líneas celulares

A partir de una placa 90-100% confluyente, se aspiró el medio y se lavó con PBS. Se añadió 700  $\mu$ l de QIAzol (Life Technologies), se resuspendió bien para recoger todas las células y se transfirió a tubos nuevos manteniéndolos en hielo. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 140  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 minutos. A continuación, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se añadió 500  $\mu$ l de etanol absoluto y la mezcla se transfirió a la columna mini RNeasy® y, se centrifugó a 9,000 rpm por 1 minuto. Se lavó la columna con 700  $\mu$ l de buffer RWT y se centrifugó 8,000 x g por 1 minuto, después se hicieron dos lavados con 500  $\mu$ l de buffer RPE y se centrifugó a 8,000 g x 2 minutos. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se añadió 30  $\mu$ l de agua libre de RNasas.



#### **4.2 Degradación de RNA lineal**

Después de extraer el RNA total tanto de la línea celular de VCaP como de los pacientes y donadores sanos, se preparó una reacción de digestión para eliminar el RNA lineal con un máximo 2 µg de RNA en un volumen de 12 µl, se añadió 1 µl de RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific), 2 µl de 10x RNasa R buffer, 1 µl de RNasa R (Lucigen, Epicentre) y 4 µl H<sub>2</sub>O. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se procedió al aislamiento de RNA circular.

#### **4.3 Extracción de RNA circular en plasma**

Para la obtención del RNA circular se partió de los 20 µl de la muestra previamente digerida y se añadió 300 µl de QIAzol se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Seguidamente, se añadió 100 µl de cloroformo, se incubó nuevamente por 3 minutos y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos. Tras obtener las fases, se separó la fase acuosa que contiene el RNA en un tubo nuevo y se continuó con el mismo procedimiento que para la extracción de RNA total a partir de plasma.

#### **4.4 Extracción de RNA circular a partir de líneas celulares**

A partir del RNA digerido se añadió 500 µl de QIAzol se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se añadió 140 µl de cloroformo, se incubó 3 minutos y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos. Se separó la fase acuosa en un tubo nuevo y se procedió a la extracción de RNA total a partir de líneas celulares.

#### **4.5 Estudio de la expresión del AR circular**

El análisis de los niveles de expresión del AR circular se llevó a cabo en las muestras de 42 pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo* y en 9 muestras de donadores sanos, a partir del RNA circular previamente extraído en plasma.

En este caso para la qPCR, el protocolo que utilizamos fue igual al descrito previamente. Los “primers” que usamos para la amplificación de AR fueron diseñados en la plataforma de *CircInteractome* (<https://circinteractome.nia.nih.gov>) como “primers” *divergentes*, para ello introducimos el gen de interés y seleccionamos el ID del RNA circular para AR hsa\_circ\_0090923 en el que el fragmento a amplificar estuviera entre 120 y 200 pb (**Figura 20**).

Circular RNA	Location	Genomic Len	Spliced Len	Samples
<a href="#">hsa_circ_0090922</a>	chrX:66788682-66950461	161779	8107	Hlhesc
<a href="#">hsa_circ_0090923</a>	chrX:66863097-66863249	152	152	Huvec
<a href="#">hsa_circ_0090924</a>	chrX:66863097-66937464	74367	702	Hlhesc
<a href="#">hsa_circ_0090925</a>	chrX:66905851-66905968	117	117	Hlhesc

hsa_circ_0090923 junction sequence (3' End - 5' End of circRNA)	
GATGAAGCTTCTGGGTGCTCACTATGGAGCTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAAGAGCCGCTGAAG	
TTTGGAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCAGAGACCTGCCTGATCTGTGGA	
Divergent primer design tools	
<a href="#">Primer3</a>	<a href="#">NCBI Primer Design</a>

**Figura 20.** Ejemplificación de la selección del RNA circular para AR y el diseño de los primers divergentes.

Por cada muestra se prepararon tres réplicas para la amplificación de circAR y GAPDH, para todas las muestras se preparó un volumen de reacción de 11 µl por pocillo. La concentración de la dilución de cDNA fue de 100 ng/µl.

Los valores de Ct se normalizaron utilizando GAPDHm como control interno para estimar la diferencia de expresión de genes. La expresión relativa de circAR se calculó usando el método  $\Delta$ Ct.

**Tabla 11.** Primers utilizados para la amplificación de los genes analizados mediante qPCR.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>GAPDH</i> Convergente	5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
<i>AR</i> Divergente	5'-GGCGATCCTTACCAATGTC-3'	5'-CCACAGATCAGGCAGGTCTT-3'

El programa de amplificación utilizado para la obtención de las curvas de fusión se expone en la siguiente Tabla:

**Tabla 12.** Representación del programa de amplificación del AR circular.

Etapa	Temperatura		Tiempo
1	95°C		10 min
2	95°C		15 seg
3	GAPDHm circAR	60°C	1 min
4	72°C		10 min
5	-		Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 40 ciclos
6	Melt curve		

#### 4.6 Electroforesis en gel de agarosa

Para asegurarnos que el producto de PCR amplificado correspondiera con nuestro gen de estudio, se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X (Tris 0.045M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 1.0 mM pH 8.0) con Syber Safe. El fragmento de la muestra tenía un tamaño aproximado de 170 pb.

La migración del DNA en el gel se monitorizó utilizando dos colorantes incluidos en el tampón de carga: el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5Kb. La electroforesis se llevó a cabo con un potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos. Los resultados obtenidos fueron capturados en un transiluminador.

#### 4.7 Purificación de DNA por Columna

La purificación de fragmentos de DNA, procedentes de la amplificación por PCR se realizó para corroborar nuestro gen de estudio y se realizó mediante PureLink® PCR Purification kit (Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A). Se mezcló el producto de PCR con 30 µl de la solución de *Binding*. Se pasó esta mezcla por la columna y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto. Posteriormente, para limpiar el DNA, se lavó la columna con 200 µl de EtOH al 70%.

A continuación, se centrifugó a 2,500 rpm durante un minuto. Se decantó y se volvió a centrifugar a máxima velocidad para secar la columna. Finalmente, el DNA pegado en la membrana se eluyó con 30  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.8 Secuenciación**

Para llevar a cabo la secuenciación por Sanger, las muestras se prepararon con 40ng de DNA purificado con 3 pmol de los primers forward y reverse correspondiente, llevado a un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción de secuenciación por Sanger se llevó a cabo en el secuenciador automático.

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó utilizando el programa *Chromas lite 2.01*. La determinación del grado de homología con las secuencias de referencia se llevó a cabo con el programa Serial Cloner.

### **5. Estudio genómico en tejido tumoral**

#### **5.1 Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado**

A partir del tejido tumoral parafinado, se realizaron 4-6 cortes de 10  $\mu$ m de los bloques FFPE y se extrajo el DNA de la muestra utilizando el kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se eliminó la parafina añadiendo a la muestra 1 mL de xileno, seguido se incubó en el baño a 37°C durante 15-30 minutos y se agitó vigorosamente cada 5 minutos para disolver la parafina. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con etanol absoluto al pellet para eliminar el xileno.

Una vez que eliminamos la parafina de la muestra, se añadieron 180  $\mu$ l de buffer ATL, 20  $\mu$ l de proteinasa K y se agitó por vórtex. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas. Transcurrido este tiempo, se le añadió a la muestra 200  $\mu$ l de buffer AL, se incubó a 70°C en baño seco por 10 min y se centrifugó. Seguido, se le añadió 200  $\mu$ l de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente.

Se transfirió la mezcla a la columna QIAamp Mini, se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min y se eliminó lo eluido. Después, se realizaron lavados con 500  $\mu$ l de buffer AW1 y buffer AW2 respectivamente. Se colocó la columna en un tubo nuevo y para la elución final de la muestra, se añadió 30  $\mu$ l de buffer AE.

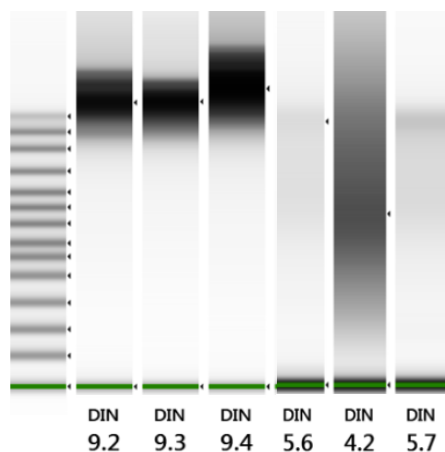
## 5.2 Cuantificación de DNA

La concentración de DNA de los tejidos tumorales parafinados y sangre periférica se midió inicialmente con un fluorómetro Qubit® 3.0 (Life Technologies). La concentración de las muestras procede de la señal que emite una molécula fluorescente sólo cuando se encuentra unida al DNA.

Para asegurar que la cantidad y calidad de DNA genómico (gDNA) en nuestras muestras de FFPE fuera óptimo, medimos el DIN que es valor del número de integridad del DNA fuera superior a 5. Para ello utilizamos el equipo Agilent 4200 Bioanalyzer que analiza fragmentos de DNA y RNA mediante electroforesis capilar a partir de 2  $\mu$ l de muestra.

Esta técnica permite la determinación del tamaño y concentración de fragmentos de PCR o librerías genómicas para secuenciación masiva e integridad de las muestras de DNA (DIN) y RNA (RIN).

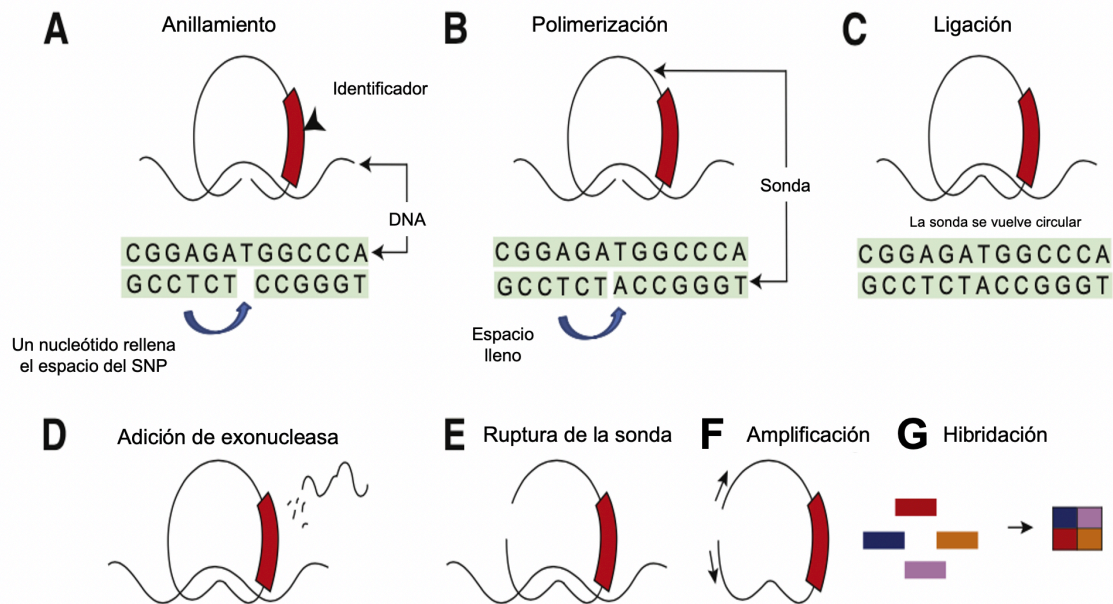
Este sistema incorpora un software de análisis que determina de forma automatizada el tamaño de los fragmentos y los cuantifica. En las muestras que obtuviéramos valores de DIN por debajo de 5 o que estuvieran degradadas, fueron descartados del estudio como se muestra en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Imagen representativa del DIN en diferentes muestras de DNA. Los valores del DIN que se encuentren más cercanos al 10 significa que la muestra es de muy buena calidad y los valores que se encuentren por debajo de 5 pueden indicar que la muestra está degradada o es insuficiente.

### 5.3 Estudio citogenético en muestras tumorales mediante MIP array con la plataforma OncoScan™

El estudio mediante microarrays genómicos con tecnología MIP (Molecular Inversion Probe) se realizó en 8 tumores de próstata. Esta técnica permite identificar diversos tipos de variación genética, incluidas las inserciones y deleciones focales, variaciones relevantes en el número de copias (CNV), pérdida de heterocigosidad (LOH). Esta tecnología que utiliza la plataforma OncoScan™ FFPE Assay permite detectar 220000 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ofreciendo una amplia cobertura del número de copias del genoma.



**Figura 22.** Ensayo MIP. **A)** Los extremos de la sonda se alinean al blanco. Un nucleótido se integra a la sonda en el SNP de interés. **B)** La brecha se llena agregando DNA polimerasa y dNTPs. **C)** La sonda se somete a ligación, se vuelve circular y se rellena el hueco del SNP. **D)** La exonucleasa elimina las sondas sin reacción y cualquier DNA restante. **E)** La sonda se rompe y el blanco se convierte en parte del segmento interno de la sonda. **F)** Los primers universales amplifican la secuencia. **G)** Hibridación en array a través de un oligo biotinilado (Rowe et al., 2013).

El DNA genómico se anilló con más de “330,000 sondas” en hielo a 20°C durante 4 min, posteriormente a 95°C por 5 min y luego a 58°C durante 16-18 horas. Después, cada muestra se dividió en dos para llenar el hueco del SNP mediante la adición de dATP (A) y dTTP (T) (A/T) en una reacción y dGTP (G) y dCTP (C) (G/C) en la otra. A continuación, se procedió a la digestión mediante la adición de exonucleasas, dejando sólo aquellas sondas que han llenado el hueco en la región hibridada, conduciendo a la circularización de la sonda de interés. Las sondas seleccionadas son linealizadas mediante el uso de enzimas de restricción y amplificadas por PCR. Una vez linealizada, los sitios de cebado están presentes en el extremo 5’ y 3’ de la sonda, lo que permite realizar una segunda amplificación PCR. La sonda amplificada está lista para la hibridación sobre un *array*.

Las muestras se mezclaron con el buffer de hibridación y se colocaron en los *arrays* donde hibridaron durante 16-18h. Al final de la hibridación, los *arrays* se tiñeron y lavaron en la GeneChip® Fluidics Station y fueron cargados en el GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) donde se escaneó la fluorescencia del *array* y se generaron las imágenes.

### **Análisis**

Los datos de intensidad de fluorescencia (CEL) se obtuvieron por medio de la consola de Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC) Software V. 4.0. (Affymetrix). Estos ficheros CEL procesados por la consola OncoScan® Console software generan unos datos OSCHIP los cuales serán cargados en el programa Chromosome Analysis Suite (ChAS) 4.0 (ThermoFisher), que proporciona el número de copias de cada sonda a partir de los datos proporcionados por el scanner de Affymetrix.



## 5.4 Análisis de genes implicados en la vía de andrógenos por NGS

### 5.4.1 Diseño del panel

Para la determinación de mutaciones puntuales de los genes implicados en la vía androgénica se diseñó un panel *custom* de enriquecimiento de captura por la compañía CELEMICS (Seoul, Korea), en el cual se incluyeron los siguientes genes diana: *SRD5A1*, *SRD5A2*, *NR3C1* y *AR*.

El enriquecimiento basado en la captura híbrida emplea sondas para capturar secuencias *target* en una biblioteca NGS. La secuencia de captura híbrida es sensible y adecuada para detectar variantes de un solo nucleótido, translocaciones, variantes estructurales, inserciones y deleciones, y variaciones en el número de copias.

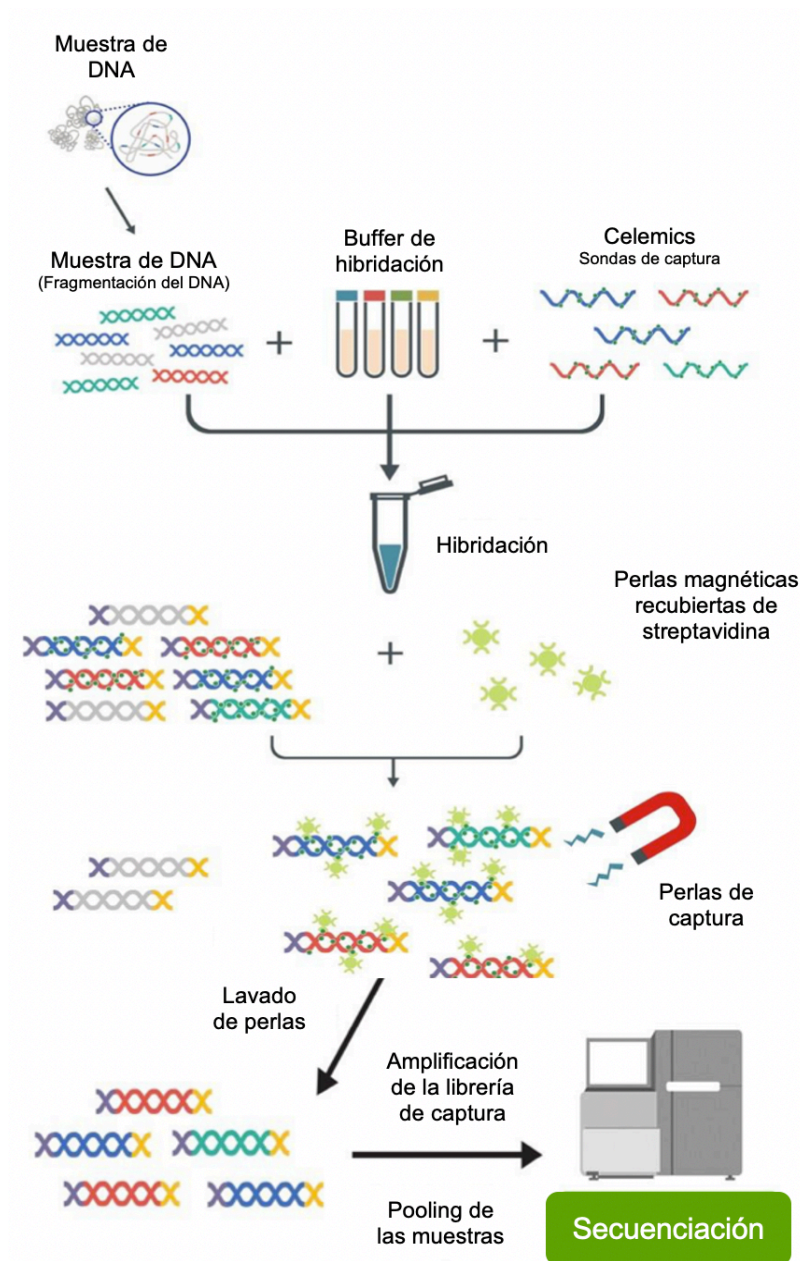
En este método, el DNA genómico se corta primero en fragmentos de tamaño específico ya sea con fragmentación mecánica o enzimática. Los adaptadores que llevan secuencias específicas de la muestra se agregan mediante una reacción de ligadura.

Un conjunto de sondas de oligonucleótidos biotiniladas (dirigidas a genes, exones y regiones genómicas de interés) se agregan al DNA ligado para unirse al adaptador en solución, para llevar a cabo la reacción de hibridación con las regiones de interés específicas.

Las sondas hibridadas son capturadas y purificadas por perlas magnéticas de streptavidina, posteriormente amplificadas y secuenciadas. El equipo utilizado para detectar los genes implicados en la vía androgénica fue el MiSeq.

### Preparación de la librería de captura

El siguiente esquema de trabajo se siguió para la amplificación de todos los genes implicados en la vía de andrógenos.

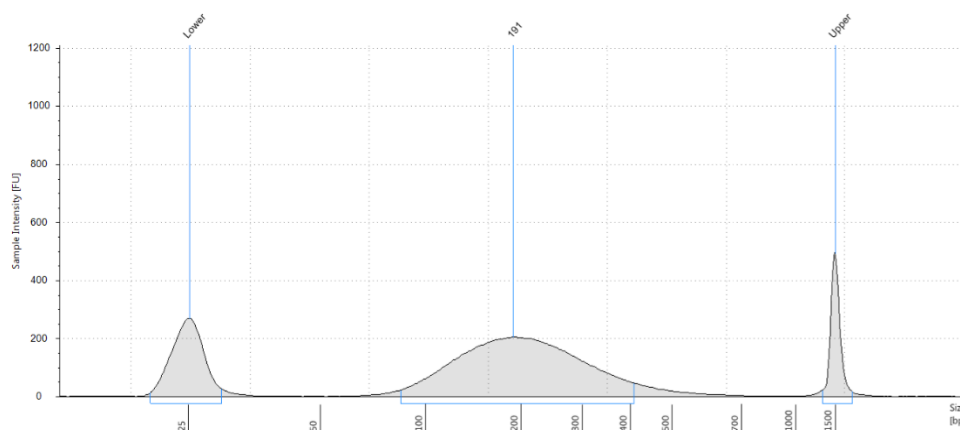


**Figura 23.** Amplificación de librerías de enriquecimiento por captura.

## 5.5 Preparación de la muestra

### Fragmentación del DNA

Después de confirmar la calidad de DNA extraído en bloques de parafina en el TapeStation, se cortó el gDNA en fragmentos de 100-500 pb para ello se utilizó una fragmentasa a 37°C durante 20 minutos. Se purificó la muestra con las perlas magnéticas (CeleMag) y se realizaron dos lavados con EtOH al 80% fresco. La purificación de las muestras se realizó como indica el fabricante y se midió en el TapeStation para asegurar que el tamaño del DNA fragmentado fuera entre 200-250 pb (**Figura 24**).



**Figura 24.** El diagrama de electroforesis muestra el tamaño del pico entre 200 y 250 pb.

### Reparación de los extremos y a-tailing

El DNA fragmentado no produce fragmentos homogéneos de *blunt-end* o “extremo romo”, estos extremos son generados cuando la enzima corta las dos hebras de DNA por el mismo lugar, generando dos extremos doble cadena. Se necesita una reparación final en los extremos para garantizar que no sobresalga una sola cadena. El a-tailing es un método enzimático para agregar un nucleótido al extremo 3' de una molécula de DNA de doble cadena *blunt-end*. Este proceso se lleva a cabo por la acción de una polimerasa de alta fidelidad que da como resultado la eliminación de cualquier nucleótido no agregado.

Para ello se preparó la mezcla en hielo con 35  $\mu$ l de la muestra, se agregaron 5  $\mu$ l de 10x ERA buffer y 10  $\mu$ l de la enzima 5x ER/A-Tailing, siguiendo las especificaciones del fabricante (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Programa del termociclador.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>1</b>	4°C	1 min.
<b>2</b>	20°C	30 min.
<b>3</b>	65°C	30 min.
<b>4</b>	4°C	$\infty$

### **Ligación de los adaptadores y tratamiento con la enzima USER**

La estructura en forma de bucle de los adaptadores aumenta la eficacia de la ligadura y minimiza la formación de dímeros. Para ello una DNA polimerasa extiende el oligo *upstream* a través de la región del DNA diana para que una DNA ligasa lo ligue al extremo 5' del oligo *downstream*.

En el DNA, las lesiones de uracilo se eliminan mediante la enzima USER que es una mezcla de uracilo-DNA glicosilasa (UDG/UNG). Los estudios sobre el tratamiento con UDG han mostrado reducciones significativas en la frecuencia de mutaciones artificiales C: G> T: A.

El proceso se realizó siguiendo especificaciones del fabricante añadiendo 10  $\mu$ l de los adaptadores directamente en la mezcla y se preparó una reacción de ligación con WGS ligasa, 5x Rapid Ligase Buffer y H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó a 20°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se añadieron 3  $\mu$ l de la enzima *USER* a cada muestra y se incubó nuevamente a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, la muestra se purificó con las perlas magnéticas.

### 5.6 Amplificación de la librería ligada por adaptadores (Dual Index)

La indexación dual se habilita agregando un index único a ambos extremos de la muestra para ser secuenciada e identificada en el análisis, se utilizan dos índices de 8 bases dentro de cada primer, el index 1 (i7) y el index 2 (i5).

Durante esta etapa se amplificaron los productos resultantes de la ligación y tratamiento con la enzima USER para ello se realizó una mezcla añadiendo 5  $\mu$ l de cada index por muestra, 25  $\mu$ l de la polimerasa CLM y 15  $\mu$ l de la librería, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguido, se llevó a cabo la reacción de PCR siguiendo las etapas que se indican en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Programa de PCR para el dual index.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1	98°C	45 seg.
2	98°C	15 seg.
3	65°C	30 seg.
4	72°C	1 min.
5	-	Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 8 ciclos
6	72°C	10 min.
7	4°C	$\infty$

Después de obtener el producto de PCR de la librería, se purificó con las perlas magnéticas Cele-Mag, seguido se midió la calidad y cantidad de DNA con el TapeStation para asegurarnos de que el tamaño de la librería fuera 120-150 pb más largo que el del DNA fragmentado inicialmente.

### 5.7 Hibridación

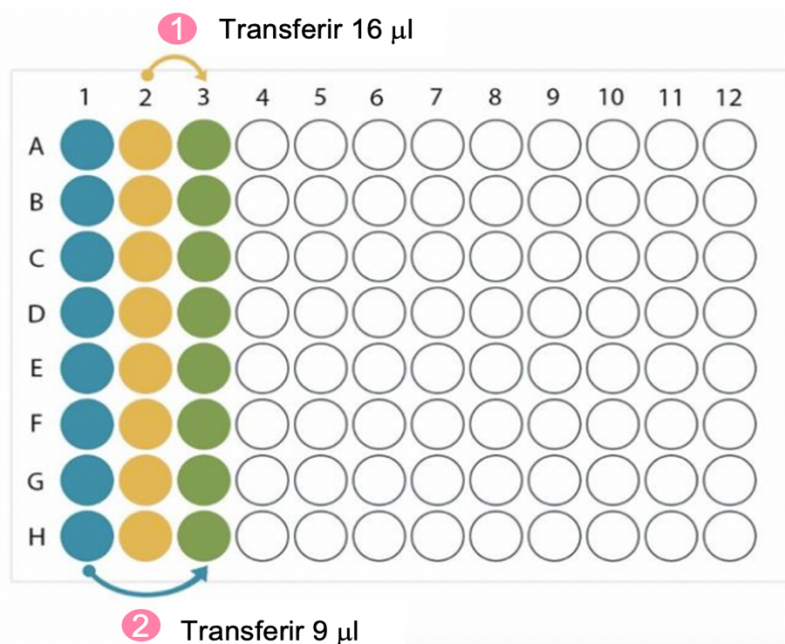
En la hibridación por captura, primero se prepara una librería genómica a partir de una muestra de DNA que se hibridará con las moléculas de los indexes agregados. Esta se puede utilizar para enriquecer fragmentos que varían en longitud desde unos cientos de bases hasta muchas mega bases (Mb) de tamaño.

Después de medir la cantidad de DNA con el TapeStation, utilizamos un *vacuum* para concentrar cada muestra en un volumen de 3.4  $\mu$ l a una concentración de 750 ng.

En primer lugar, la mezcla se preparó en una placa de 96 pocillos, en la primera columna se añadió los 3.4  $\mu\text{l}$  de muestra y el block mix, siguiendo especificaciones del fabricante, se incubó a 95°C durante 5 minutos y se mantuvo la muestra a 65°C.

Pasado el tiempo de incubación, en la columna 2 se añadieron 25  $\mu\text{l}$  del buffer de hibridación y se incubó nuevamente a 65°C durante 5 minutos. Para la preparación de la librería de captura, se preparó una mezcla en un volumen de 7  $\mu\text{l}$  con las Target Capture Probe #1-2 y se añadieron a la tercera columna, seguido se incubaron a 65°C durante 2 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 16  $\mu\text{l}$  del buffer de hibridación de la columna 2 a la columna 3. Seguido, se transfirió 9  $\mu\text{l}$  del volumen total de la librería de la columna 1 a la columna 3, siguiendo indicaciones del fabricante se incubó a 65°C por 16 horas como se muestra en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Representación del proceso de hibridación en placa.

Para garantizar que la hibridación resultante fuera la adecuada, se utilizó un recubrimiento de perlas de streptavidina como indica el fabricante. De esta manera, el DNA se encontrará retenido dentro de estas perlas durante la amplificación posterior a la captura.

### 5.8 Amplificación de la librería de captura

Las librerías de gDNA son amplificadas por PCR a partir del uso de 2.5  $\mu$ l de un par de primers *post* captura, 25  $\mu$ l de CLM polimerasa y 15  $\mu$ l de la muestra. Posteriormente se llevo a cabo la PCR en un termociclador siguiendo las etapas que se indican en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Programa de PCR para la amplificación de la librería.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1	98°C	45 seg.
2	98°C	15 seg.
3	60°C	30 seg.
4	72°C	1 min.
5	-	Repetir las etapas 2, 3 y 4 por 14 ciclos
6	72°C	10 min.
7	4°C	$\infty$

### 5.9 Purificación de la librería

En esta etapa de nuevo se purificaron los productos de las PCRs siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó con el TapeStation que la librería estuviera en la región de 300 pb.

### 5.10 Secuenciación en el equipo MiSeq (Illumina)

Una vez cuantificadas y normalizadas todas las muestras, se procedió a la secuenciación de estas en un equipo MiSeq (Illumina) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la secuenciación de estas muestras se utilizó un cartucho V3.

## **Análisis de las variantes**

Los resultados obtenidos en la secuenciación fueron analizados utilizando los siguientes programas de análisis:

**Variant Studio Software Illumina™ 3.0 (Illumina, San Diego, CA).** Es una poderosa herramienta de análisis y generación de datos, permite identificar, filtrar y clasificar las variantes más relevantes para la enfermedad y generar un informe.

## **Bases de datos**

En este trabajo hemos utilizado diversas bases de datos que se explican a continuación:

**PUDMED.** Es un archivo gratuito de revistas biomédicas de libre acceso, creada por la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos.

**UCSC.** Es un navegador que ofrece acceso a los datos de la secuencia del genoma de una variedad de especies, proporcionados por la universidad de California Santa Cruz.

**ClinVar-NCBI.** Es un archivo público y de acceso gratuito de variantes genéticas humanas, aportando información sobre el significado clínico de una variante o un conjunto de variantes. Además, contiene evidencia bibliográfica sobre las variantes estudiadas por diversos grupos de investigación.

**gnomAD.** Es una base de datos de agregación del genoma, es una plataforma de acceso gratuito, con el objetivo de agregar y armonizar los datos de secuenciación del genoma y del exoma de una amplia variedad de estudios de secuenciación a gran escala.

**Varsome.** Es una herramienta de búsqueda, que permite la identificación de variantes genómicas, ya que recopila datos de múltiples bases de datos.



## 6. Estudios con Proteínas

### 6.1 Extracción de proteínas a partir de líneas celulares

La extracción de proteínas a partir de líneas celulares de cáncer de próstata, se llevó a cabo a partir de las células de una placa confluyente 90-100%, se lavaron con PBS y se utilizó el “scraper” para levantar las células de la placa. A continuación, se añadió 1mL de buffer de lisis (NaCl 140mM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20mM pH 8.0) con inhibidores de proteasas y se transfirió a un tubo nuevo en hielo. La muestra se incubó durante 30 minutos, se mezcló por vórtex cada 10 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Tras obtener todos los extractos se procedió a realizar la medición de la concentración proteica por Bradford. Los extractos fueron almacenados a -80°C para su posterior uso.

### 6.2 Extracción de proteínas en plasma

La albúmina puede constituir del 50-70% de las proteínas séricas totales y la inmunoglobulina G (IgG) del 10- 25%. El kit de eliminación de Albúmina/IgG ProteoExtract® proporciona un método rápido, reproducible y altamente específico para eliminar simultáneamente la albúmina sérica y la IgG de muestras de fluidos corporales como plasma, suero o líquido cefalorraquídeo. La complejidad de la muestra se reduce significativamente eliminando la albúmina y la IgG, lo que permite la detección de proteínas de baja abundancia.

Se partió de 30 µl de plasma y se siguió el procedimiento especificado por el fabricante. Se añadieron 850 µl de binding buffer ProteoExtract® a la columna y se dejó pasar por flujo de gravedad y se eliminó lo eluido. En un tubo nuevo, se diluyó la muestra con 270 µl de binding buffer, se transfirió a la columna y se recolectó lo eluido en un tubo nuevo. Utilizando el mismo tubo de recolección, se lavó dos veces la columna con 600 µl de binding buffer por flujo de gravedad y se recogieron las fracciones eluidas que contienen la muestra deplecionada.

### 6.3 Electroforesis capilar con inmunoensayo

La electroforesis capilar con inmunoensayo o el análisis de SimpleWestern se realizaron con la máquina WES™ (ProteinSimple Santa Clara, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta técnica, permite que las proteínas se separen por tamaño, se inmovilicen y se incuben con anticuerpos específicos. La intensidad de la señal se detecta mediante un sistema de quimioluminiscencia conjugada con peroxidasa y los datos se muestran como un electroferograma.

El ensayo de proteínas totales (ProteinSimple) se utilizó para la detección de proteínas en las muestras de plasma, previamente deplecionadas y en las líneas celulares usadas como controles para AR y ARv7.

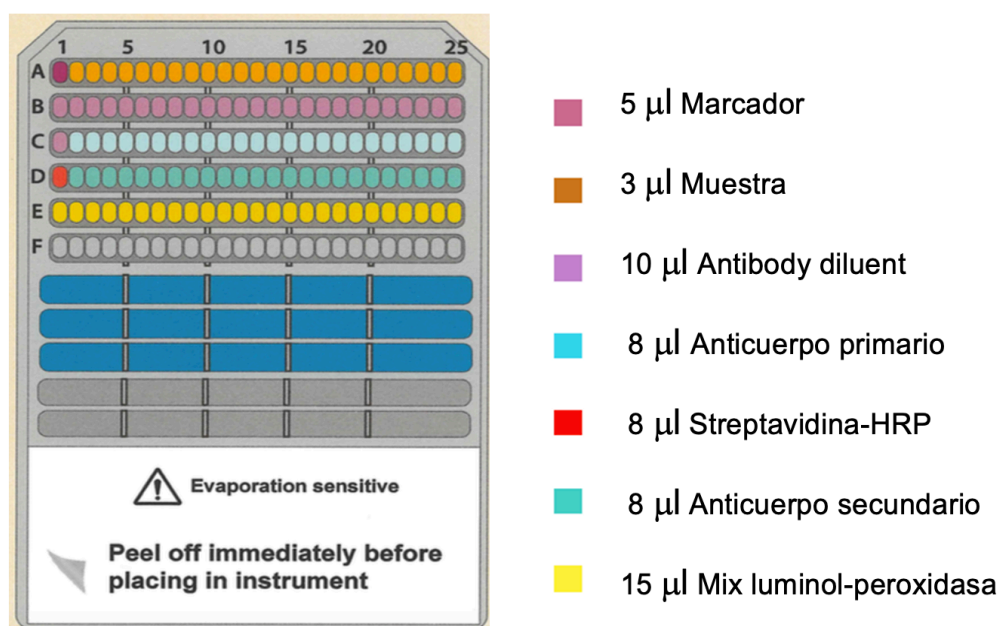
Se prepararon los reactivos liofilizados contenidos en el standard pack: DTT, 5X Master Mix y el marcador, y se siguió el procedimiento especificado por el fabricante. Los reactivos y las muestras se preservaron en hielo para evitar su degradación. Se agregaron 40  $\mu$ l de agua desionizada al tubo con DTT para obtener una solución 400 mM, para preparar el 5X Master Mix se añadió al tubo 20  $\mu$ l de sample buffer 10X y 20  $\mu$ L de la solución preparada de DTT. Para el marcador se añadió 16  $\mu$ l de agua desionizada, 2  $\mu$ l de sample buffer 10X y 2  $\mu$ l de la solución preparada de DTT. El sustrato se preparó en un tubo nuevo añadiendo 200  $\mu$ l Luminol-S y 200  $\mu$ l de peroxidasa.

La muestra se preparó en un tubo nuevo añadiendo 12  $\mu$ l proteína y 3  $\mu$ l de 5X Master Mix. Después, se desnaturalizó la muestra junto con el marcador a 95°C durante 5 minutos. Los anticuerpos utilizados en el estudio y las condiciones optimizadas para cada anticuerpo se presentan en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Isotipo	Tipo	Concentración WB	Casa comercial	Tamaño de la proteína
<b>GAPDH</b>	Primario	Rabbit	1:50	Cell Signaling (2118)	42 kDa
<b>AR</b>	Primario	Rabbit	1:25	Santa Cruz sc-7305	
<b>ARv7</b>	Primario	Rabbit	1:25	abCam (ab198394)	

Después de desnaturalizar las muestras, se dispensaron los reactivos dentro de los pocillos de la placa usando los volúmenes indicados por el fabricante (**Figura 26**). Una vez colocados los reactivos y muestras en la placa se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para eliminar burbujas.



**Figura 26.** Representación de una placa empleada para el inmunoensayo.

Los datos se analizaron utilizando el software Compass™. Cada pico de proteína se midió automáticamente y se normalizó con respecto al área media de GAPDH debajo del pico. La expresión de cada proteína se presenta como su abundancia en relación con GAPDH.

## **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 25.0.

Los parámetros clinicopatológicos (edad, PSA, plaquetas) se contrastaron con la presencia de los genes diana de mRNA por el T de Student y para la puntuación de gleason y tipo de metástasis se usó el test de chi-cuadrado.

Los datos de RT-qPCR se expresaron como  $\Delta Ct$ : la diferencia en Ct entre el gen control (*GAPDH*) y el Ct medio del gen de estudio (*ITGA2B*, *AR*, *ARv7*, *ARv567* y *circAR*). El modelo de clasificación que utilizamos para separar los grupos de expresión fue un log-likelihood ratio para cada gen de estudio.

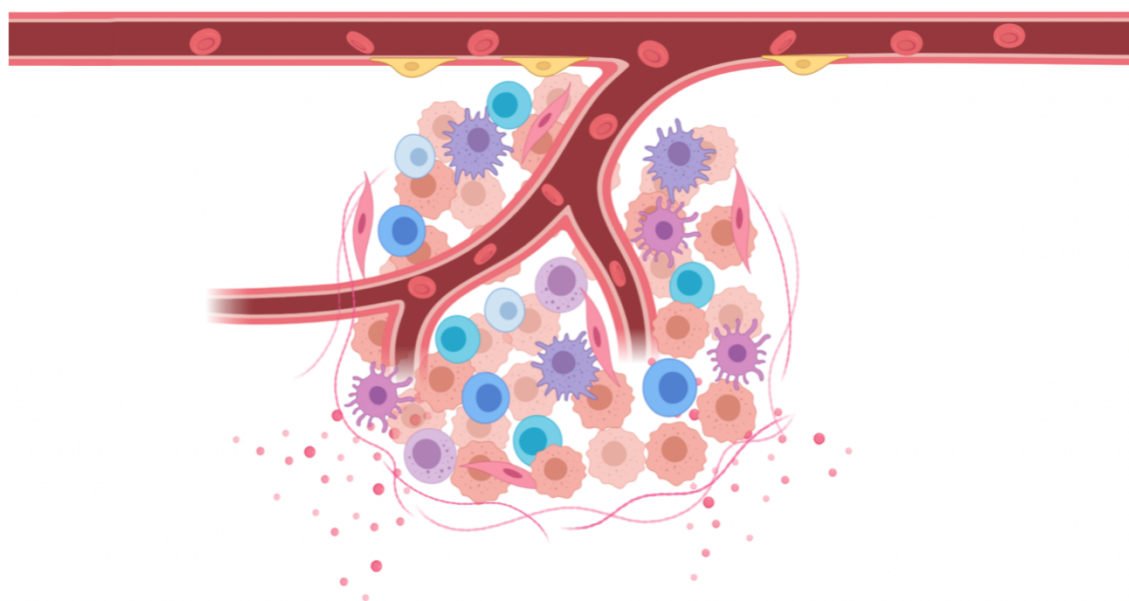
Por lo que, como medida de tendencia central fue utilizada la mediana y como medidas de dispersión se usaron los percentiles 25-75%. Los valores de medianas fueron comparados entre pacientes de alta expresión vs baja expresión y alta expresión vs donador sano, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para representar gráficamente los resultados obtenidos, se seleccionaron gráficas de tipo box plot, las cuales se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.

La relación entre la probabilidad acumulada de la supervivencia global comparación entre los factores predictivos analizados se calculó con el método de Kaplan Meier, mientras que las diferencias significativas entre las curvas se evaluaron con el test long-rank. Para ello, se consideró la fecha de diagnóstico (2015) hasta la fecha de fallecido o último seguimiento (2020).

Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como diferencias significativas para todos los estudios analizados.



# Resultados

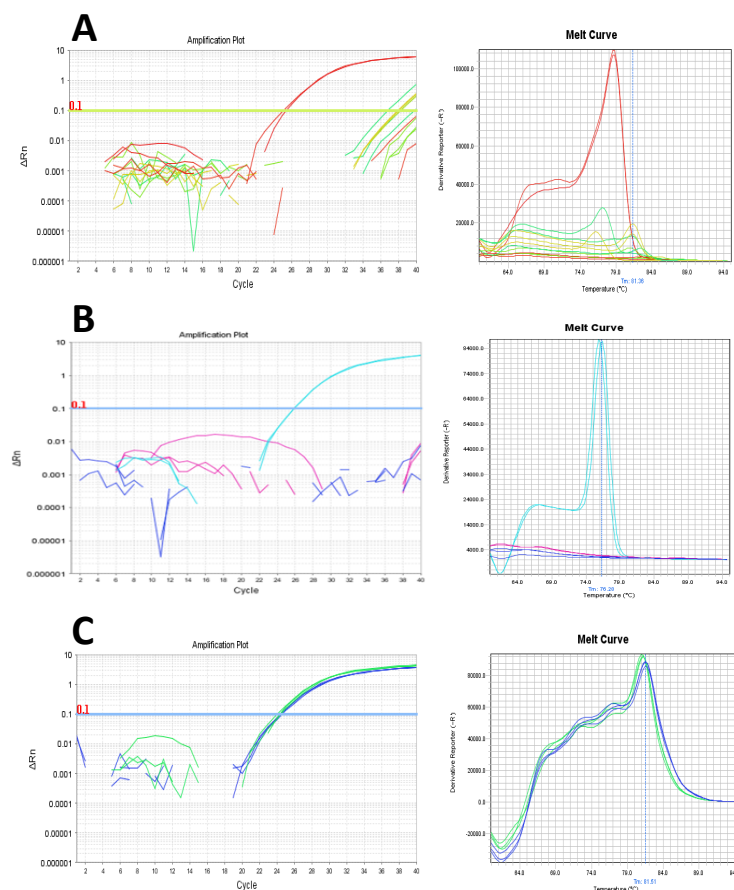




## 1. Estudio del gen *AR* y sus variantes en sangre periférica de pacientes con CaP metastásico de *novo*

### 1.1 Estudio de la expresión de *AR* y sus variantes en células mononucleares de sangre periférica por qPCR

El estudio del perfil de expresión del gen *AR* y sus variantes a partir de RNA de células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante RT-qPCR en 20 pacientes. Para poner a punto la técnica utilizamos la línea celular VCaP. El análisis de los resultados mostró la expresión de *AR-FL* y sus variantes (*ARv7* y *ARv567*) en la línea VCaP. El estudio en sangre periférica de los 20 pacientes no detectamos niveles de expresión de *AR-FL* (**Figura 27-A**) ni *ARv7* (**Figura 27-B**) en ningún paciente, únicamente se detectó la presencia de la isoforma *ARv567* en 3 pacientes (15%) (**Figura 27-C**).



**Figura 27.** Representación gráfica de la amplificación de *AR* y sus variantes en pacientes a partir de células mononucleares. **A)** Expresión de *AR*. **B)** Expresión de *ARv7*. **C)** Expresión de *ARv567*.



Las características clínico-patológicas de los pacientes que expresaban ARv567 se describen en la **Tabla 17**. La edad al diagnóstico varió, siendo el más joven con 56 años el paciente 22.

Se encontró que todos los pacientes presentaban un índice de Gleason alto >8 y predominada la metástasis de tipo M1b. También, observamos que los pacientes 18 y 22 presentaban un alto número de metástasis óseas. Por otro lado, el paciente 18 tenía altos niveles de PSA (1750 ng/ml) y recibió tratamiento de ADT.

**Tabla 17.** Características de los pacientes que expresan ARv567.

Nº de paciente	Edad	PSA ng/ml	Índice de Gleason	Tipo de Mtx	Nº de Mtx óseas	TTO	Status paciente
15	61	3,24	9	M1b	ND	ND	Exitus
18	84	1750	10	M1b	Generalizada (16)	ADT	Exitus
22	56	234,2	9	M1b	Generalizada (14)	ND	Vivo

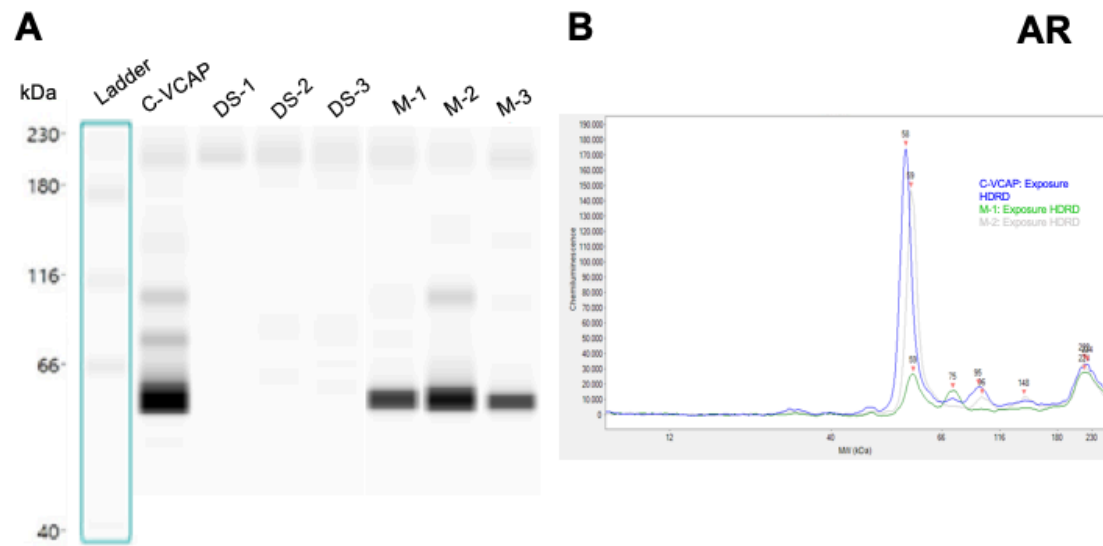
Mtx: Metástasis, M1b: Metástasis a distancia/Hueso, TTO: Tratamiento, ADT: Terapia de privación de andrógenos, ND: No dato.

## 2. Estudio de la expresión del gen *AR* y sus variantes en plasma de pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo*

### 2.1 Detección de proteínas de AR mediante la técnica de Simple West

Numerosos estudios confirman que la proliferación del CaP está impulsada por la activación de la vía de señalización del AR, siendo la isoforma ARv7 la que se expresa con mayor frecuencia; sin embargo, el mecanismo regulador que controla la estabilidad de la proteína ARv7 no se comprende completamente. Por esta razón, evaluamos la presencia de AR-FL y ARv7 en el plasma de pacientes de pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo*.

En 39 de 42 pacientes (86%) se detectó expresión de AR-FL, no detectándose en sangre periférica de donador sano. En la **Figura 28** se muestra la representación de un pseudogel en el que se observa un fragmento de aproximadamente 60 kDa en VCaP y en las muestras representativas de los pacientes M1-M3.



**Figura 28.** Representación de la detección de AR. Imagen representativa, datos presentados en formatos de pseudogel y electroferograma. **A)** Pseudogel para la detección de AR presentando una banda de aproximadamente 60 kDa, positivo para VCaP y M1-M3, DS negativos. **B)** Picos de la señal de AR en la línea celular y pacientes. En azul la línea celular VCaP, en verde la M1 y en gris la M2.

Una vez estandarizado el estudio de AR por el método del Simple West, se realizó una correlación con los parámetros clínicos. No obstante, este análisis tiene un valor muy limitado debido a la diferencia de pacientes que alberga cada grupo: 3 casos en el grupo que no expresa (AR-) y 39 casos en el grupo que lo expresa (AR+) (**Tabla 18**). El grupo de pacientes AR+ presentaban una media de edad de 75,15 años, con un índice de Gleason de >8 (69,23%) y un 12,8% con grado 7. Las metástasis eran mayoritariamente de tipo M1b (82,05%).

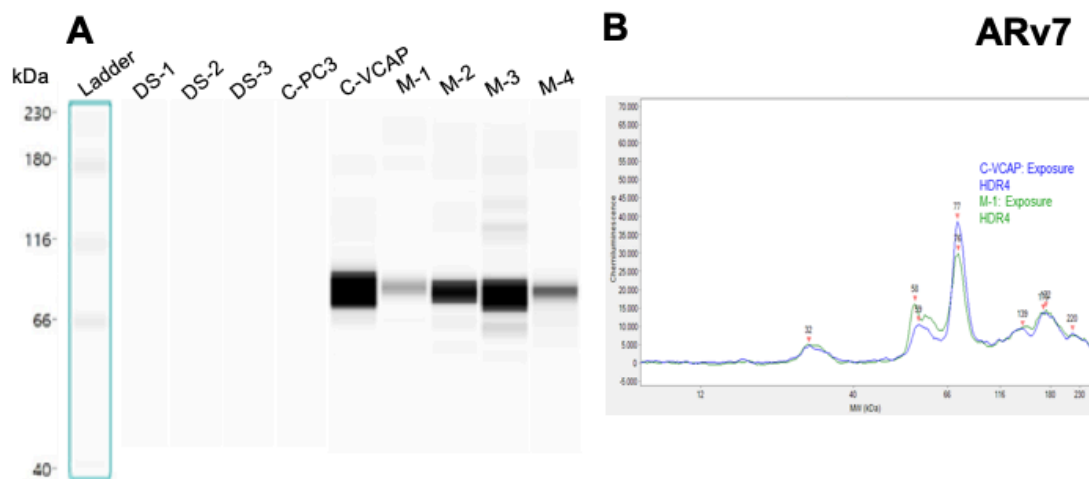
**Tabla 18.** Características clínico-patológicas y su asociación con la detección de AR en plasma de pacientes.

Parámetros Clínicos		AR- (n=3)	AR+ (n=39)	p-valor
Edad (SD)		70,6 (3,79)	75,15 (10,42)	0,467
Plaquetas (SD)		221 (141,31)	279,02 (112,03)	0,402
PSA ng/ml (SD)		739,91 (1277,46)	320,79 (447,62)	0,628
Índice de Gleason	7	0	5 (12,8)	0,668
	>8	1 (33,33)	27 (69,23)	
	ND	2 (66,66)	7 (17,94)	
Tipo de Mtx	M1a	0	2 (5,13)	0,212
	M1b	2 (66,66)	32 (82,05)	
	M1c	1 (33,33)	2 (5,13)	
	ND	0	3 (7,69)	
Status	Vivo	2 (66,66)	18 (46,15)	0,398
	Exitus	1 (33,33)	21 (53,85)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

## 2.2 Detección de proteínas de ARv7 mediante la técnica de Simple West

Como se muestra en la **Figura 29**, el inmunoensayo de electroforesis capilar detectó un fragmento específico en la línea celular de VCaP con un tamaño de 80 kDa aproximadamente, correspondiente a ARv7. Esta isoforma estaba presente en 14 casos (33,33%) y en ningún donador sano.



**Figura 29.** Representación de la detección de ARv7. **A)** Resultado de la detección de ARv7 C-VCaP y cuatro muestras de pacientes fueron positivas, 3 muestras de DS y C-PC3 fueron negativas. **B)** Picos de la señal de AR-v7. En azul la línea celular VCaP y en verde la M-1.

Al relacionar la presencia de ARv7 con las características clínicas se observó, que el número de plaquetas y los niveles de PSA estaban ligeramente incrementados en el grupo de pacientes ARv7+ en comparación con el grupo de ARv7-. La edad media al diagnóstico fue de 74,35 años en el grupo ARv7- y para el grupo de ARv7+ fue de 75,8 años.

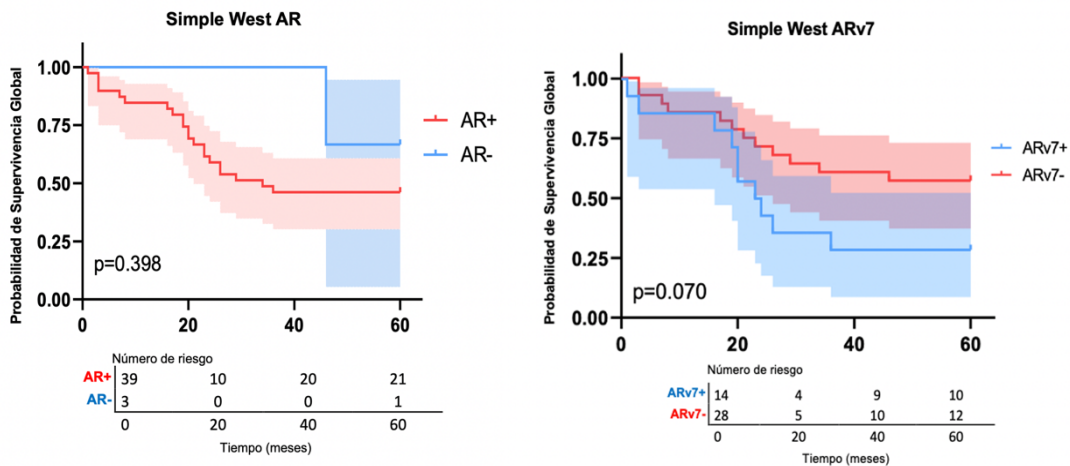
En la **Tabla 19**, se puede observar que en ambos grupos más del 60% de los casos presentaban un índice de Gleason >8 y una metástasis de tipo M1b. Sin embargo, en el análisis estadístico de estos dos grupos no se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 19.** Características clínico-patológicas y su asociación con la detección de ARv7 en plasma de pacientes.

Parámetros Clínicos		ARv7- (n=28)	ARv7+ (n=14)	p-valor
Edad (SD)		74,35 (10,01)	75,8 (10,68)	0,672
Plaquetas (SD)		243,5 (81,25)	314,76 (154,23)	0,115
PSA ng/ml (SD)		320,45 (547,71)	411,26 (503,06)	0,608
Índice de Gleason	7	4 (14,28)	1 (7,14)	0,586
	>8	19 (67,86)	9 (64,29)	
	ND	5 (17,86)	4 (28,57)	
Tipo de Mtx	M1a	1 (3,57)	1 (7,14)	0,876
	M1b	23 (82,14)	11 (78,57)	
	M1c	2 (7,14)	1 (7,14)	
	ND	2 (7,14)	1 (7,14)	
Status	Vivo	16 (57,14)	4 (28,57)	<b>0,070</b>
	Exitus	12 (42,86)	10 (71,43)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

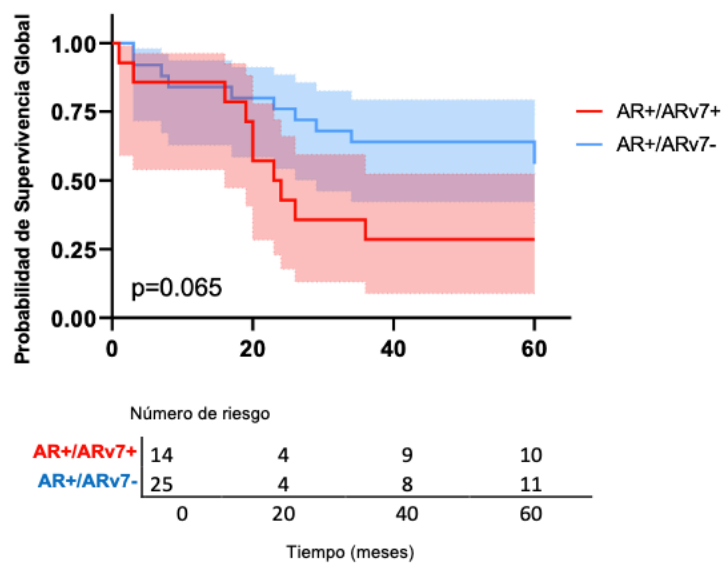
Si analizamos los datos tras 60 meses de seguimiento, los pacientes que presentaban ARv7+ al diagnóstico tenían una menor supervivencia global (28,57%) comparada con los del grupo de ARv7- (57,14%). Como se muestra en la **Figura 30**, las curvas Kaplan y Meier muestran una tendencia a la significación (**p=0.070**).



**Figura 30.** Supervivencia global según la presencia o ausencia de AR y ARv7 en el plasma de pacientes con CaP.

Con el fin de estudiar estos dos marcadores juntos y establecer una correlación con la supervivencia global (SG), analizamos en conjunto los pacientes en los que se detectó AR+/ARv7+ (14 pacientes) y en los que expresaban AR, pero no ARv7 (25 pacientes).

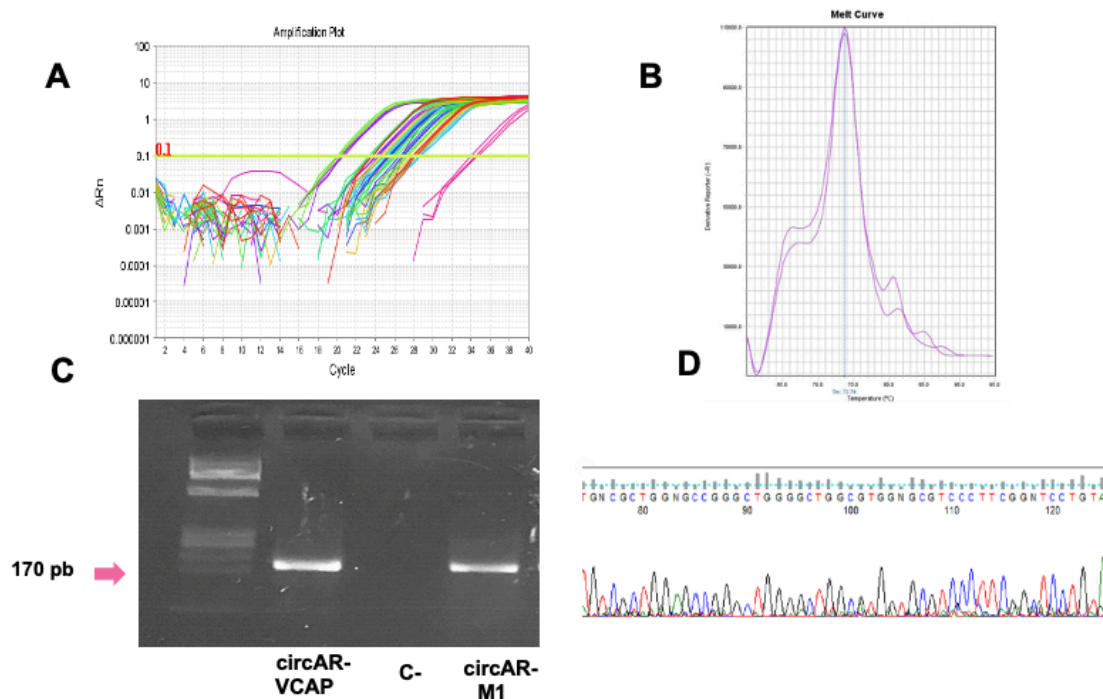
Como podemos observar en la **Figura 31**, existe una tendencia a la significación estadística entre la supervivencia global y la detección de AR+/ARv7+ ( $p= 0.065$ ), la mortalidad de este grupo resultó ser de 71,43% (10 pacientes), mientras que la del grupo AR+/ARv7- fue de 44% (11 pacientes).



**Figura 31.** Supervivencia global según la presencia o ausencia de AR+/ARv7+ y AR+/ARv7- en el plasma de pacientes con CaP.

### 2.3 Estudio de circRNA derivados del gen AR

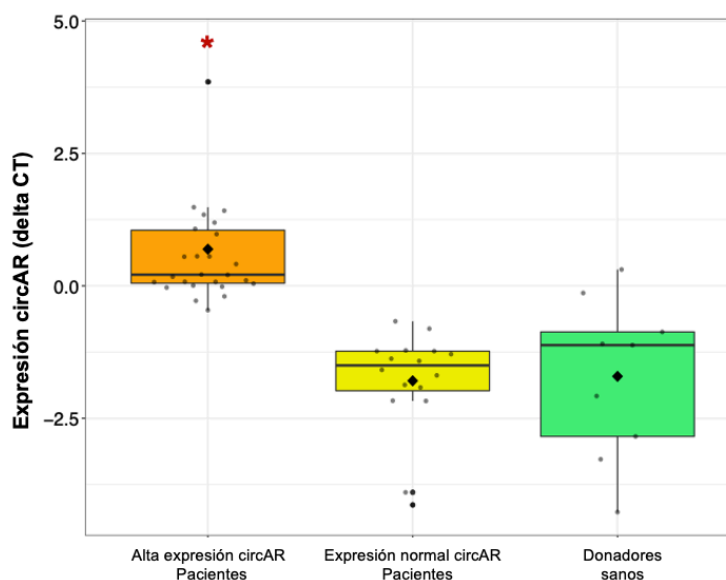
Para determinar el patrón de expresión de circAR en los pacientes con CaP, primero realizamos una RT-qPCR para poner a punto la técnica utilizando como control positivo la línea celular VCaP y la muestra de un paciente. Las curvas de amplificación por qPCR incluyeron una porción lineal como se muestra en la **Figura 32-A**. La detección de un único pico en la *Melt curve* representa un solo producto de PCR de la reacción de amplificación (**Figura 32-B**); finalmente, el producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 2%, encontrándose un fragmento único de aproximadamente 170 pb como se muestra en la **Figura 32-C**. Con el fin de confirmar que el producto de PCR correspondía al RNA circular del AR, se purificaron las muestras y se secuenció por Sanger (**Figura 32-D**).



**Figura 32.** Amplificación y validación de circAR. **A)** Gráfico de amplificación por RT-qPCR en los pacientes. **B)** Representación de una Melt Curve, un sólo pico indica que se amplificó un único producto de PCR. **(C)** Ilustración esquemática de los productos RT-qPCR visualizados por electroforesis en geles de agarosa. **(D)** Análisis de secuenciación de DNA del producto de PCR de la imagen C.

Después de validar la presencia de circAR, se evaluaron los niveles de expresión en las muestras de 42 pacientes y 9 donadores sanos. Para ello se realizó una RT-qPCR, normalizando los niveles de expresión con el gen *GAPDH*. La cuantificación relativa de los niveles de expresión de circAR se calculó mediante el método de  $\Delta Ct$ .

Se determinó el valor de la mediana e intervalos 25-75% de la expresión de circAR en pacientes y donadores sanos. Se observó que, de los 42 pacientes incluidos en el estudio, 26 presentaban alta expresión de circAR (61,90%) y 16 presentaban expresión normal (38,09%) (**Figura 33**). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de alta expresión y el de expresión normal ( $p = <0.001$ ).



**Figura 33.** Comparación de medianas e intervalos entre grupos de expresión de circAR en pacientes con CaP y DS. \* $P < 0.001$  (Prueba Kruskal-Wallis).

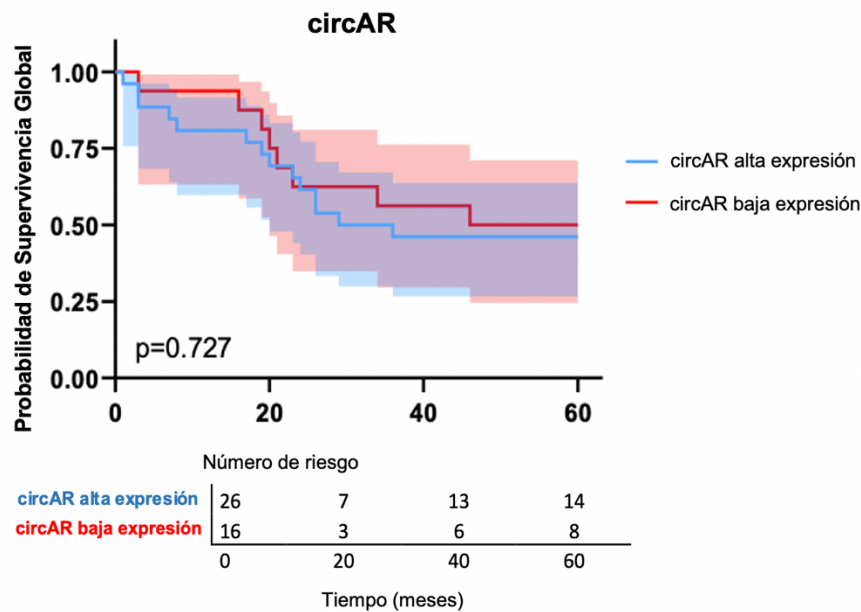
Las características clínico-patológicas de estos pacientes se describen en la **Tabla 20**. Los pacientes que presentan alta expresión de circAR tienen una edad media de 76,07 años. El índice Gleason es alto en la mayoría de los casos 19 pacientes (73,07%). El tipo de metástasis que predomina es de tipo M1b (84,61%); sin embargo, los niveles de expresión de circAR no se correlacionaron con los niveles de PSA.

**Tabla 20.** Características clínico-patológicas y su asociación con la expresión de circAR.

Parámetros Clínicos		circAR expresión normal (n=16)	circAR alta expresión (n=26)	P-valor
Edad (SD)		72,81 (9,30)	76,07 (10,60)	0,317
Plaquetas (SD)		257,94 (91,68)	286,45 (127,69)	0,452
PSA ng/ml (SD)		328,59 (598,16)	366,09 (490,95)	0,828
Índice de Gleason	7	3 (18,75)	2 (7,69)	0,233
	>8	9 (56,25)	19 (73,07)	
	ND	4 (25)	5 (19,23)	
Tipo de Mtx	M1a	1 (6,25)	1 (3,85)	0,531
	M1b	12 (75)	22 (84,61)	
	M1c	2 (12,5)	1 (3,85)	
	ND	1 (6,25)	2 (7,69)	
Status	Vivo	8 (50)	12 (46,15)	0,727
	Exitus	8 (50)	14 (53,84)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

Si analizamos los datos de supervivencia global de acuerdo con los niveles de expresión de circAR, tampoco observamos diferencias significativas (**Figura 34**).



**Figura 34.** Curva de supervivencia global en relación con los niveles de expresión de circAR.



### 3. Estudio del gen *AR* y sus variantes en plaquetas de pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo*

El estudio del perfil de expresión del gen *AR* y sus variantes (*ARv7* y *ARv567*) a partir de RNA de plaquetas circulantes de pacientes con cáncer de próstata metastásicos *de novo* se realizó en varias etapas.

Primero comprobamos la expresión del gen *ITGA2B*, también conocido como CD41. Este gen codifica la cadena  $\alpha 2b$  de la integrina, que se encuentra abundantemente en la superficie de las plaquetas, por lo que se utilizó como marcador plaquetario. Para ello, se realizó un estudio mediante RT-qPCR a partir del RNA de plaquetas aisladas en plasma de pacientes con CaP y de donador sano.

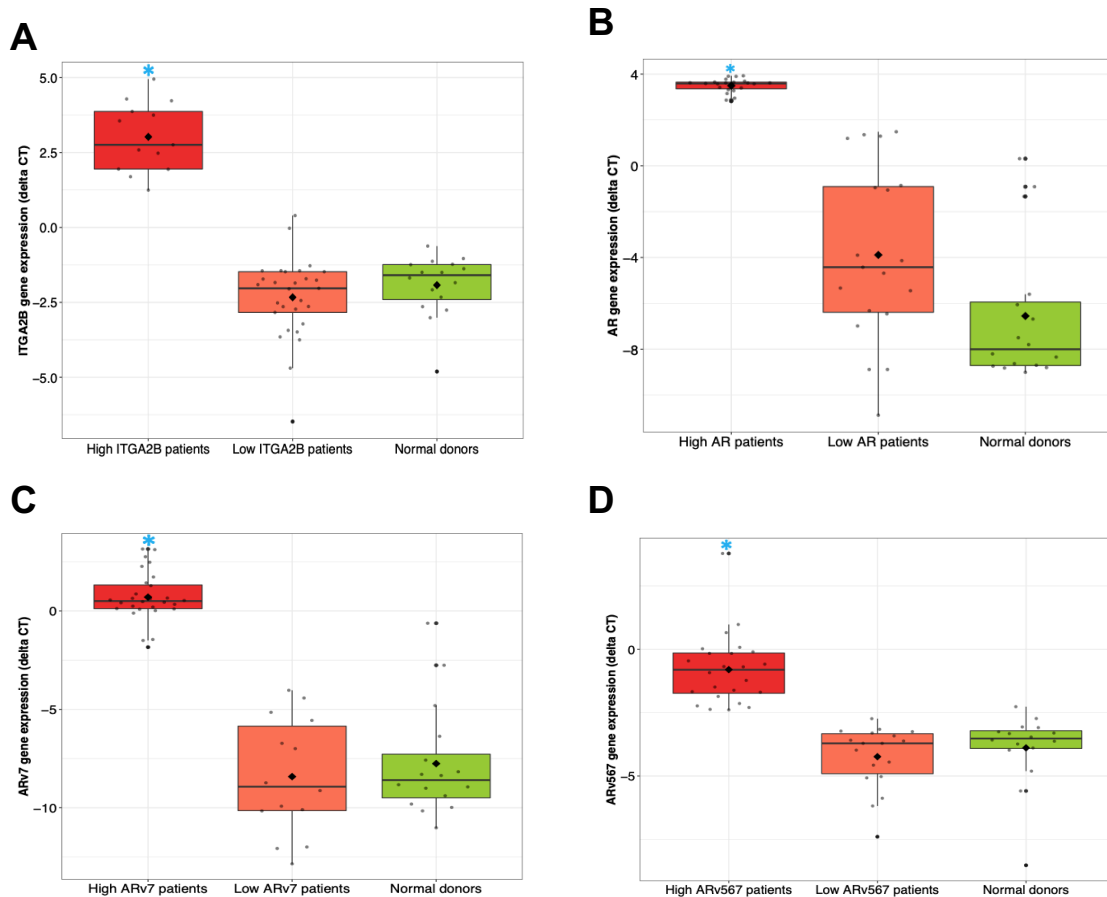
En segundo lugar, evaluamos los niveles de expresión de *AR-FL*, *ARv7* y *ARv567* mediante RT-qPCR utilizando *GAPDH* para normalizar los niveles de expresión. La cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen *ITGA2B*, así como del gen *AR-FL* y sus variantes, se calculó mediante el método de  $\Delta Ct$ . Para el análisis de los resultados se determinó el valor de la mediana e intervalos 25-75% de la expresión de los genes de estudio (*ITGA2B*, *AR*, *ARv7* y *ARv567*) en 42 pacientes y 16 donadores sanos.

En la **Tabla 21** se comparan los niveles de expresión de cada gen incluido en el estudio, divididos en dos grupos según los niveles de expresión: alta expresión y expresión normal (este grupo presentaba niveles de expresión similares al de los sujetos sanos). Se observa que 13 pacientes presentaban alta expresión del gen *ITGA2B*, 23 pacientes de *AR-FL*, 28 pacientes de *ARv7* y 24 pacientes de *ARv567*.

**Tabla 21.** Comparación de los niveles de expresión de mRNA en los diferentes genes de estudio en pacientes con cáncer de próstata metastásico *de novo*.

Gen de estudio	Alta Expresión (n)	Expresión Normal (n)
<i>ITGA2B</i>	13	29
<i>AR</i>	23	19
<i>ARv7</i>	28	14
<i>ARv567</i>	24	18

En la **Figura 35**, se representa el comportamiento de las medianas e intervalos 25-75% de la expresión de mRNA a partir de plaquetas para cada gen de estudio.



**Figura 35.** Expresión relativa de los genes analizados en pacientes y donador sano. **A)** ITGA2B, **B)** AR, **C)** ARv7 y **D)** ARv567. Los extremos de la caja indica el primer y el tercer cuartil, la línea dentro de la caja representa la mediana.

Se realizó un análisis para determinar si existía correlación entre las características clínico-patológicas y los grupos de expresión de cada gen incluido en el estudio, incluyendo variables como la edad, niveles de PSA, índice de Gleason y el tipo de metástasis. Además de los parámetros clínicos, analizamos los grupos de expresión en relación con la supervivencia global, con el fin de corroborar si niveles altos de expresión en los pacientes se asociaba con una SG más baja y una mayor tasa de mortalidad.

### 3.1 Estudio de la expresión del gen *ITGA2B*

El grupo de pacientes con expresión normal del gen *ITGA2B* presentaba una media de edad de 73,93 años, mientras que, los de alta expresión tenían una media de 77,46 años. Además, se observó que los pacientes con expresión normal tenían un nivel de PSA mayor (381,49 ng/ml) en comparación con los de alta expresión (288,50 ng/ml). No se encontraron diferencias de los niveles de plaquetas entre ambos grupos de expresión.

En ambos grupos predominaba un índice de Gleason >8. También presentaban una metástasis de tipo M1b en la mayoría de los casos (**Tabla 22**).

**Tabla 22.** Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de *ITGA2B*.

Parámetros clínicos		ITGA2B expresión normal (n=29)	ITGA2B alta expresión (n=13)	P-valor
Edad (SD)		73,93 (10,31)	77,46 (9,54)	0,300
Plaquetas (SD)		277,77 (124,02)	276,58 (77,18)	0,976
PSA ng/ml (SD)		381,49 (562,37)	288,50 (459,59)	0,606
Índice de Gleason	7	4 (13,79)	1 (7,69)	0,438
	>8	18 (62,07)	11 (84,62)	
	ND	6 (20,70)	1 (7,69)	
Tipo de Mtx	M1a	1 (3,44)	1 (7,69)	0,679
	M1b	25 (86,21)	10 (76,92)	
	M1c	1 (3,45)	1 (7,69)	
	ND	2 (6,90)	1 (7,69)	
Status	Vivo	17 (58,62)	3 (23,08)	<b>0,011</b>
	Exitus	12 (14,38)	10 (76,92)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

No obstante, sólo se encontraron diferencias significativas en relación con la supervivencia global entre ambos grupos (**p= 0,011**). Como se muestra en la **Figura 36**, encontramos que el grupo de pacientes que presentaba niveles de expresión altos del gen *ITGA2B* presentaban una peor supervivencia global.

Estos datos sugieren que, la presencia de altos niveles de expresión del gen *ITGA2B* está relacionado con una mayor mortalidad (76,92%).

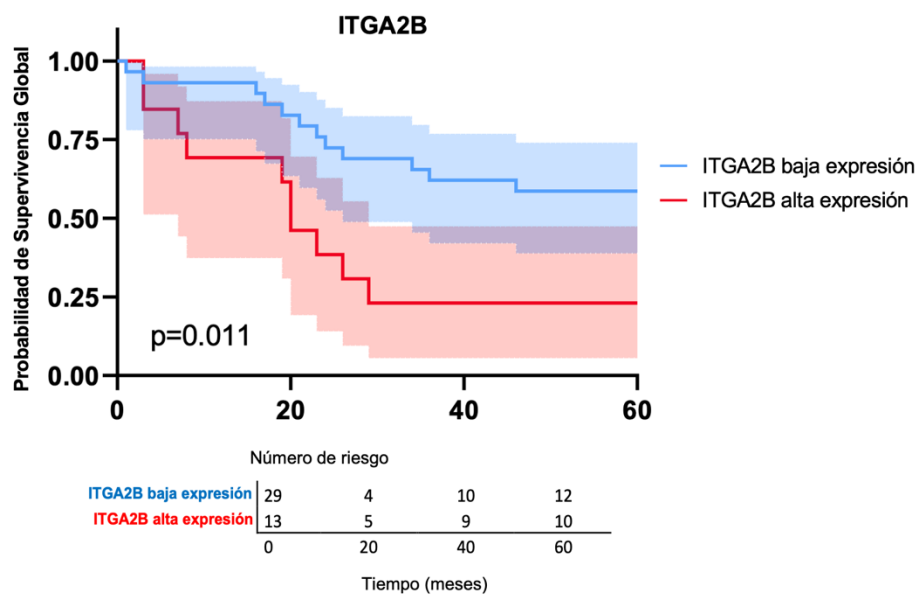


Figura 36. Curva de SG en relación con los niveles de expresión del gen *ITGA2B*.

### 3.2 Estudio del transcrito *AR-FL*

El estudio del transcrito completo del gen del receptor de andrógenos mostró que 23 pacientes presentaban alta expresión (54,76%) y 19 pacientes presentaban expresión normal (45,24%) del mismo. El grupo de alta expresión presentaba una media de edad menor (73 años) en comparación con el grupo de expresión normal (77,05 años).

18 pacientes con alta expresión de *AR* presentan un índice de Gleason alto >8 y metástasis de tipo M1b en el 78,26% de los casos. En el grupo de expresión normal se observa que tienen niveles de PSA ligeramente más elevados, 364,44 ng/ml, en comparación con el de alta expresión, 341,29 ng/ml.

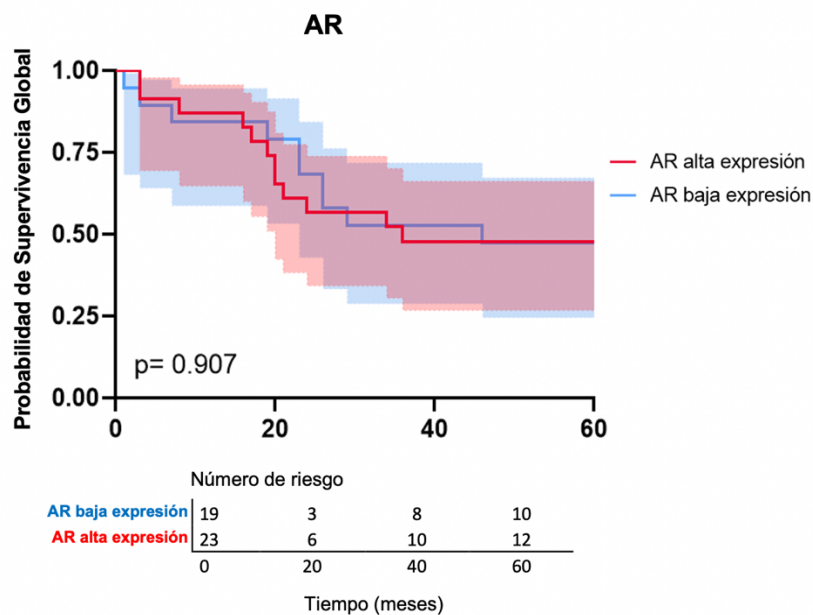
También se encontró que el 52,63% que tenían expresión de *AR* normal presentaban un índice de Gleason alto, con una metástasis de tipo M1b en 16 pacientes (Tabla 23). No obstante, no se encontraron diferencias entre los grupos.

**Tabla 23.** Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de AR.

Parámetros Clínicos		AR expresión normal (n=19)	AR alta expresión (n=23)	P-valor
Edad (SD)		77,05 (10,42)	73 (9,73)	0,201
Plaquetas (SD)		261,37 (78,62)	283,95 (134,26)	0,552
PSA ng/ml (SD)		364,44 (541,99)	341,29 (529,42)	0,891
Índice de Gleason	7	4 (21,05)	1 (4,35)	0,065
	>8	10 (52,63)	18 (78,26)	
	ND	5 (26,31)	4 (17,39)	
Tipo de Mtx	M1a	1 (5,26)	1 (4,35)	0,284
	M1b	16 (84,21)	18 (78,26)	
	M1c	0	3 (13,04)	
	ND	2 (10,52)	1 (4,35)	
Status	Vivo	9 (47,37)	11 (47,83)	0,907
	Exitus	10 (52,63)	12 (52,17)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

Al analizar la supervivencia global en función de la expresión del gen AR, no encontramos diferencias significativas (**Figura 37**).



**Figura 37.** Curva de supervivencia global en relación con la expresión del gen AR.

### 3.3 Estudio del transcrito ARv7

El análisis de expresión de la variante ARv7 puso de manifiesto que 28 pacientes (66%) presentaban alta expresión, con una media de edad de 73,10 años. Por otro lado, 14 pacientes (33%) presentaban niveles de expresión normales con una media de edad de 78,28 años. Estos datos demuestran una tendencia a la significación ( $p=0,069$ ) sin embargo, habría que aumentar el número de pacientes para confirmarlo (**Tabla 24**).

También observamos que el grupo de alta expresión de ARv7 presentaba niveles de PSA más altos (402 ng/ml) y una mayor mortalidad 60,71% en comparación con el grupo de expresión normal (237,61 ng/ml y 35,71% respectivamente), aunque las diferencias no son significativas.

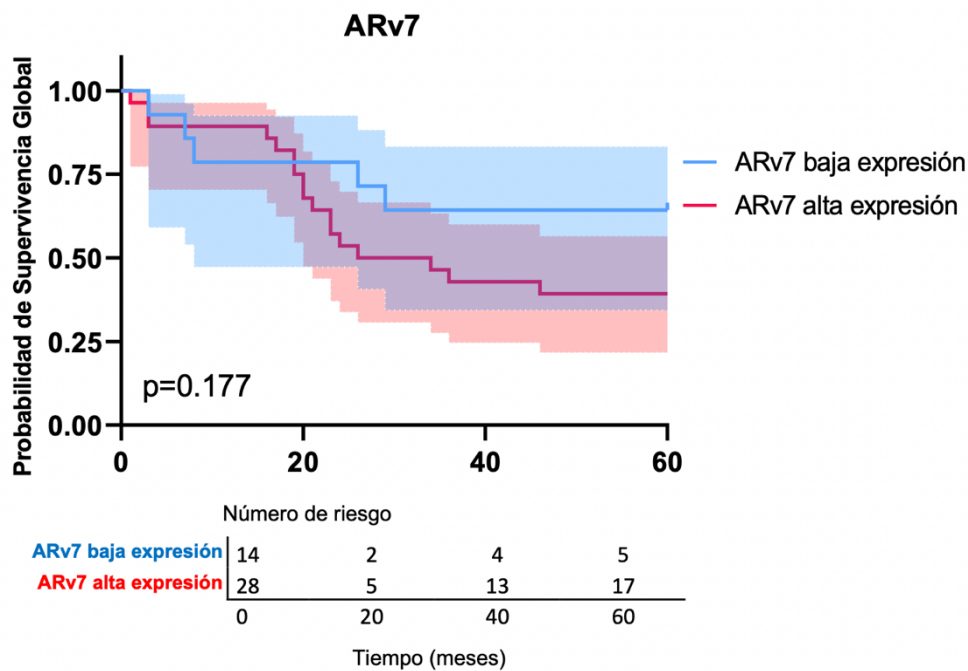
**Tabla 24.** Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de la variante ARv7.

Parámetros Clínicos		ARv7 expresión normal (n=14)	ARv7 alta expresión (n=28)	P-valor
Edad (SD)		78,28 (6,68)	73,10 (11,18)	0,069
Plaquetas (SD)		237,61 (55,25)	293,6 (131,10)	0,151
PSA ng/ml (SD)		240,85 (468,17)	402,81 (554,52)	0,368
Índice de Gleason	7	1 (7,14)	4 (14,28)	0,409
	>8	11 (78,57)	17 (60,71)	
	ND	2 (14,28)	7 (25)	
Tipo de Mtx	M1a	1 (7,14)	1 (3,57)	0,911
	M1b	12 (85,71)	22 (78,57)	
	M1c	1 (7,14)	2 (7,14)	
	ND	0	3 (10,71)	
Status	Vivo	9 (64,29)	11 (39,29)	0,177
	Exitus	5 (35,71)	17 (60,71)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

El análisis de los niveles de expresión de la variante ARv7 tras 60 meses de seguimiento mostró que el grupo de alta expresión presentaba una mayor tasa de mortalidad 60,71% (17 pacientes) en comparación con el grupo de expresión normal 35,71% (5 pacientes).

En el conjunto de pacientes, se observa que los que presentan baja expresión de ARv7 tienen una mayor supervivencia global (**Figura 38**).



**Figura 38.** Curva de supervivencia global en relación con la expresión del ARv7.

### 3.4 Estudio del transcrito ARv567

El análisis de expresión de la variante ARv567 mostró que 24 pacientes (57%) presentaban alta expresión y 18 (43%) expresión normal. No se encontraron diferencias entre la media de edad entre ambos grupos 75,83 y 74,08 años, respectivamente.

Como se muestra en la **Tabla 25**, el 75% de los pacientes con alta expresión presentaban un índice de Gleason >8, con metástasis de tipo M1b en el 91,66%. Por otro lado, los pacientes de expresión normal también presentaban un gleason de alto grado en el 55,55% de los casos y metástasis de tipo M1b en el 66,67%.

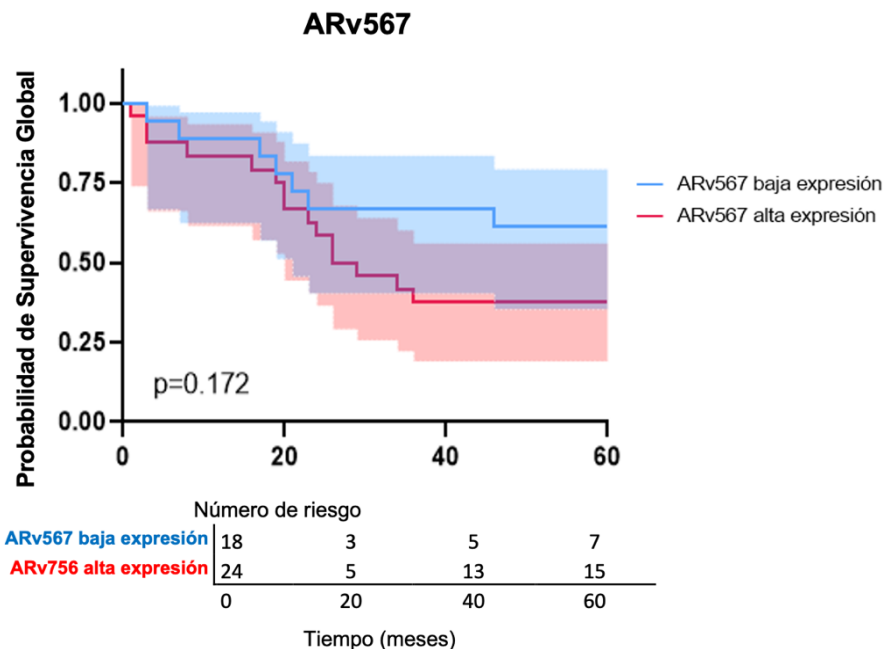
Los niveles de PSA se encontraban ligeramente incrementados en el grupo de alta expresión 380,72 ng/ml frente al de expresión normal 314,07 ng/ml, pero sin alcanzar significación estadística.

**Tabla 25.** Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de ARv567.

Parámetros Clínicos		ARv567 expresión normal (n=18)	ARv567 alta expresión (n=24)	P-valor
Edad (SD)		75,83 (7,64)	74,08 (11,77)	0,563
Plaquetas (SD)		267,47 (96,15)	280,09 (127,79)	0,738
PSA ng/ml (SD)		314,07 (560,7)	380,72 (512,40)	0,694
Índice de Gleason	7	3 (16,67)	2 (8,33)	0,306
	>8	10 (55,55)	18 (75)	
	ND	5 (27,78)	4 (16,67)	
Tipo de Mtx	M1a	2 (11,11)	0	0,125
	M1b	12 (66,67)	22 (91,66)	
	M1c	2 (11,1)	1 (4,17)	
	ND	2 (11,11)	1 (4,17)	
Status	Vivo	11 (61,11)	9 (37,5)	0,172
	Exitus	7 (38,89)	15 (62,5)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

Al analizar la supervivencia de los pacientes a 60 meses, no encontramos diferencias entre grupos de pacientes.



**Figura 39.** Curva de supervivencia global en relación con la expresión de la variante ARv567.



### 3.5 Correlación de las características clínico-patológicas en relación con la supervivencia global y la expresión de las variantes ARv7-ARv567

Al analizar los niveles de expresión de las AR-V por separado encontramos que ambas variantes (ARv7 y ARv567) podrían estar relacionadas con una menor SG y con una mayor tasa de mortalidad en los pacientes.

Por ello, realizamos un análisis para comparar los pacientes que presentaban niveles altos de estas dos variantes (ARv7+/ARv567+) con los que tenían niveles bajos de expresión (ARv7-/ARv567-), correlacionándolo con las características clínicas y la supervivencia global. Encontramos que 17 pacientes pertenecían al grupo de ARv7+/ARv567+ y 13 pacientes al de ARv7-/ARv567-.

Como se muestra en la **Tabla 26**, podemos observar que el grupo de ARv7+/ARv567+ presenta una media de edad menor (72,12 años) en comparación con el grupo de ARv7-/ARv567- (77,69 años).

Además, encontramos que los niveles de PSA son mayores en el grupo de ARv7+/ARv567+ (374,52 ng/ml).

**Tabla 26.** Características clínico-patológicas y su asociación con los niveles de expresión de ARv7+/ARv567+ y ARv7-/ARv567-.

Parámetros Clínicos		ARv7+/ARv567+ (n=17)	ARv7-/ARv567- (n=13)	P-valor
Edad (SD)		72,12 (12,77)	77,69 (6,13)	0,128
Plaquetas (SD)		300 (146,62)	245,54 (71,83)	0,235
PSA ng/ml (SD)		374,52 (467,55)	88,46 (91,45)	<b>0,024</b>
Índice de Gleason	7	1 (5,88)	0	0,366
	>8	13 (76,47)	11 (84,62)	
	ND	3 (17,65)	2 (15,38)	
Tipo de Mtx	M1a	0	2 (15,38)	0,169
	M1b	15 (88,23)	9 (69,23)	
	M1c	1 (5,88)	2 (15,38)	
	ND	1 (5,88)	0	
Status	Vivo	6 (35,29)	12 (92,31)	<b>0,003</b>
	Exitus	11 (64,70)	1 (7,69)	

SD: Desviación estándar, Mtx: Metástasis, ND: No dato.

Al comparar las tasas de mortalidad, se observó que el grupo ARv7+/ARv567+ presentaba una mayor tasa de mortalidad y una menor supervivencia global en comparación con el grupo de pacientes que no expresan estas variantes ( $p=0,003$ ) (Figura 40).

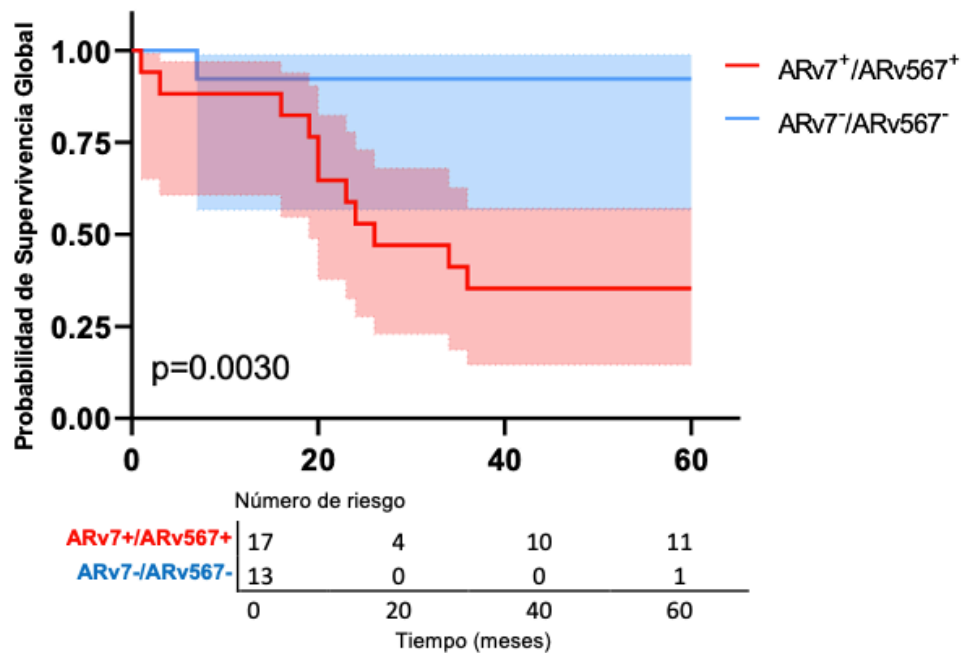


Figura 40. Curva de supervivencia global en relación con la expresión de las AR-V.

Con el fin de establecer una mejor correlación con los niveles de expresión previamente obtenidos. Realizamos un análisis entre los pacientes que presentaban altos niveles de expresión tanto de *AR-FL* como de sus variantes, es decir que eran positivos para todos marcadores (*AR-FL+/ARv7+/ARv567+*), en relación con sus características clínicas.

De los 42 pacientes incluidos en el estudio, se encontró que 10 pacientes expresaban altos niveles de expresión de *AR+/ARv7+/ARv567+*. 23 pacientes para *AR-FL*, 28 para *ARv7+*, 24 para *ARv567+* y 17 pacientes para *ARv7+/ARv567+* (Tabla 27).

**Tabla 27.** Asociación de niveles de expresión en plaquetas circulantes en pacientes con cáncer de próstata metastásico de *novu*.

Nº de paciente	Expresión en plaquetas circulantes		
	AR-FL	ARv7	ARv567
1	N	N	+
2	N	N	+
3	N	N	+
4	N	+	N
5	N	+	+
6	N	N	N
7	N	+	+
8	N	N	N
9	+	+	+
10	N	+	N
11	+	+	N
12	N	N	+
13	N	+	+
14	+	+	N
15	N	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	N	+
19	+	+	+
20	+	N	+
21	+	+	N
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	N
25	+	N	+
26	+	N	N
27	+	N	N
28	+	N	N
29	+	N	N
30	+	+	N
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	N	N
34	+	+	+
35	+	+	+
36	N	+	+
37	N	+	N
38	N	+	N
39	N	+	+
40	N	+	+
41	N	+	N
42	N	+	N

+: Alta expresión  
N: Expresión normal

La edad media de los 10 pacientes que presentaban altos niveles de expresión de AR-FL+/ARv7+/ARv567+ fue de 66,8 años. Por otro lado, la mayoría de los pacientes presentaba un índice de Gleason >8 y metástasis de tipo M1b. El 70% de los pacientes habían fallecido a los 5 años.

**Tabla 28.** Asociación de los parámetros clínicos con los niveles de expresión de AR y sus variantes y la presencia de sus proteínas.

Nº de paciente	Edad	PSA ng/ml	Índice de Gleason	Tipo de Mtx	Nº de Mtx óseas	TTO	SW-AR	SW-ARv7	Status del paciente
9	50	20,77	10	M1b	Generalizada (8)	ADT	+	-	Exitus
16	67	0,003	7	M1b	ND	ND	+	-	Vivo
17	84	1374	ND	M1b	Generalizada	ADT	+	+	Exitus
19	65	166,7	10	M1c	Generalizada	ADT	+	+	Exitus
22	56	234,2	9	M1b	Generalizada (14)	ND	+	-	Vivo
23	72	1325	8	M1b	ND	ND	+	+	Vivo
31	71	160,8	10	M1b	Generalizada	ND	+	+	Exitus
32	56	9,43	10	M1b	Generalizada	ADT	+	+	Exitus
34	77	771,1	9	M1b	Generalizada	ADT	+	+	Exitus
35	70	18,17	10	M1b	Generalizada (6)	ND	+	+	Exitus

Mtx: Metástasis, M1b: Metástasis a distancia/Hueso, M1c: Metástasis a distancia/Otras localizaciones  
TTO: tratamiento, ADT: terapia de privación de andrógenos, ND: No dato. SW: Simple West, +: Presencia, -: Ausencia

Como se muestra en la **Tabla 28**, se encontró que de los 10 pacientes que tenían expresión de AR-FL sólo 7 eran también ARv7+ y la presencia de la isoforma ARv7 podría estar relacionada con la supervivencia.

### 3.6 Correlación de niveles de expresión de circAR y AR-FL en plaquetas circulantes

De los 42 pacientes estudiados, 26 pacientes presentaban alta expresión de circAR y 23 pacientes de AR-FL en plaquetas. 13 pacientes expresaban simultáneamente altos niveles de circAR y AR-FL en las plaquetas circulantes (**Tabla 29**).

Tabla 29. Asociación de los niveles de expresión de circAR y AR en plaquetas.

Nº de paciente	Niveles de expresión	
	circAR	AR-FL en Plaquetas
1	+	N
2	+	N
3	+	N
4	+	N
5	+	N
6	N	N
7	+	N
8	+	N
9	N	+
10	N	N
11	N	+
12	+	N
13	+	N
14	N	+
15	+	N
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	N	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	N	+
28	N	+
29	N	+
30	+	+
31	N	+
32	+	+
33	+	+
34	N	+
35	N	+
36	N	N
37	N	N
38	N	N
39	+	N
40	+	N
41	+	N
42	N	N

+: Alta expresión  
N: Expresión normal

11 de los 13 pacientes con niveles altos de expresión presentaba un índice de gleason de alto grado, predominando las metástasis de tipo M1b (11/13). Además, se observó que, de estos 13 pacientes, 6 (16,17,19, 22, 23, 32) estaban relacionados con altos niveles de expresión de *AR/ARv7/Arv567* (Tabla 27 y 30).

**Tabla 30.** Correlación de los niveles de expresión de circAR y *AR-FL* en plaquetas circulantes en pacientes con cáncer de próstata metastásico de novo.

Nº de paciente	Edad	PSA ng/ml	Índice de Gleason	Tipo de Mtx	Nº de Mtx óseas	TTO	Status del paciente
16	67	0,003	7	M1b	ND	ND	Vivo
17	84	1374	ND	M1b	Generalizada	ADT	Exitus
18	84	1750	10	M1b	Generalizada (16)	ADT	Exitus
19	65	166,7	10	M1c	Generalizada	ADT	Exitus
20	77	23,69	8	M1b	Generalizada (2)	NC	Vivo
22	56	234,2	9	M1b	Generalizada (14)	ND	Vivo
23	72	1325	8	M1b	ND	ND	Vivo
24	71	54,37	10	M1b	Generalizada (7)	ADT	Exitus
25	81	154,1	9	M1b	ND	ADT	Exitus
26	83	134,4	8	M1b	Generalizada	ADT	Vivo
30	68	1143	9	M1b	Generalizada	QT	Exitus
32	56	9,43	10	M1b	Generalizada	ADT	Exitus
33	83	121,4	9	M1a	ND	ADT	Vivo

Mtx: Metástasis, M1b: Metástasis a distancia/Hueso, M1c: Metástasis a distancia/Otras localizaciones, TTO: Tratamiento, ADT: Terapia de privación de andrógenos, QT: Quimioterapia, ND: No dato.

## 4. Estudio genómico de cáncer de próstata en tejido tumoral

### 4.1 Análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de cáncer de próstata

En los últimos años se han desarrollado múltiples sistemas de estratificación de riesgo en los pacientes con cáncer de próstata, combinando parámetros clínicos-patológicos (índice de gleason, niveles de PSA, etc) con estudios moleculares que podrían ayudar a distinguir el cáncer de próstata indolente del agresivo (Cooperberg et al., 2009). Las nuevas plataformas de *microarrays* permiten el estudio de las alteraciones genómicas en el tumor con una mayor resolución que las técnicas convencionales utilizadas anteriormente.

Para la determinación de alteraciones en el número de copias (CNAs) hemos estudiado, mediante la plataforma OncoScan™ (Thermo Fisher Scientific), 8 muestras de tumores embebidos en parafina procedentes de pacientes con cáncer de próstata.

De acuerdo con la edad en el diagnóstico tumoral los pacientes se clasificaron en dos grupos: adultos (5 pacientes) y jóvenes menores de 50 años (3 pacientes). Dentro del grupo de los adultos se incluyeron: 3 pacientes metastásicos *de novo* y 2 CPRC con un índice de Gleason >8 considerado de alto grado y un PSA promedio de 380,9 ng/ml. En los casos de los jóvenes se incluyeron 2 pacientes de bajo riesgo y 1 de alto riesgo según la clasificación de la EAU, que presentaron un índice de Gleason de bajo grado y un PSA bajo en comparación con el grupo de los adultos. Las características clínico-patológicas se resumen en la **Tabla 5**.

Estudios recientes han explorado las bases moleculares del cáncer de próstata primario identificando múltiples alteraciones genómicas recurrentes que incluyen mutaciones, cambios en el número de copias del DNA, reordenamientos y fusión de genes (Baca et al., 2013). En nuestro estudio, hemos observado una mediana de 87 segmentos alterados por caso, con un mayor número de ganancias de material genómico (44,5 segmentos por caso) que pérdidas (mediana de 33 segmentos por caso), como se muestra en la **Tabla 31**.

**Tabla 31.** Comparación de la ganancia y pérdida de segmentos entre pacientes jóvenes y adultos.

Nº de muestra	# Total Seg	# Gain Seg	# Loss Seg	# LOH Seg	Autosome LOH	Frequency Heterozygous Call	Frequency Homozygous Call	Genome LOH
40367	58	31	27	46	0.0713953	0.380324	0.619676	0.119158
40369	59	33	26	22	0.0257068	0.345135	0.654865	0.0758752
40373	68	36	32	40	0.174053	0.327346	0.672654	0.216411
40352	109	84	25	26	0.0470999	0.324736	0.675264	0.096142
40358	138	96	42	16	0.0305216	0.325534	0.674466	0.0804364
40354	77	40	37	44	0.0636475	0.368548	0.631452	0.111818
40361	143	109	34	21	0.0721562	0.327332	0.672668	0.119879
40365	97	49	48	40	0.147253	0.392244	0.607756	0.191022
Mediana	87	44.5	33	33	0.0675214	0.3362405	0.6637595	0.115488

Observamos que el número de alteraciones genómicas era superior en los casos de adultos respecto a los menores de 50 años (la mediana de cambios por caso es de 109 en adultos frente a 59 en jóvenes). Sin embargo, la presencia de regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH) era superior en los casos jóvenes con una mediana de 40 segmentos por casos frente a 26.

Las CNAs son una subclase importante de mutaciones somáticas, amplificaciones o deleciones asociadas con oncogenes sobreexpresados o con la pérdida de genes supresores de tumores (TSG) (Pinkel & Albertson, 2005). Por tanto, el estudio de las CNAs se puede utilizar para identificar genes *driver* implicados en la carcinogénesis (Yeh et al., 2014).

Las CNAs en forma de ganancias observadas con una mayor recurrencia en nuestros pacientes, se localizaron principalmente en las regiones 3p21.1-3p14 (7/8, 87,5%), 20p11.1 y 20q13.12 (6/8, 75%). En cuanto a las pérdidas de material genómico, las regiones con mayor recurrencia se encontraron en 8p23 (5/8, 62,5%), 19p13 (5/8, 62,5%), 6q25.3 y 16q24.3 (4/8, 50%). Estos datos se recogen en la **Tabla 32**.

**Tabla 32.** Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en el conjunto de tumores con cáncer de próstata.

	Cromosoma	Región		Casos	Frecuencia	Posibles genes implicados
<b>GANANCIAS</b>	3	p21.1	p14	7/8	87,5%	<b>MIFT</b>
	20	p11.1		6/8	75%	<b>MACROD2</b> , SEL1L2
	20	q13.12		6/8	75%	SLC12A5, NCOA5
	9	q34.2		5/8	62,5%	CACNA1B, EHMT1, EXD3, PNPLA7
	11	q13.3		4/8	50%	CCND1
	15	q26.3		4/8	50%	IGF1R
	17	q22	q23.1	4/8	50%	YPEL2, LINC01476, DHX40, CLTC, PTRH2, VMP1, MIR21, TUBD1, RPS6KB1, RNFT1, TBC1D3P1-DHX40P1, LOC101927755
	X	q12		4/8	50%	<b>AR</b>
<b>PERDIDAS</b>	8	8p23.1	p21.3	5/8	62,5%	<b>DLC1</b> , <b>MSR1</b> , PCM1
	19	p13.1		5/8	62,5%	PLPP2, MIER2, THEG, C2CD4C, SHC2, ODF3L2, MADCAM1
	6	q25.3		4/8	50%	IGF2R, AIRN, LOC729603, SLC22A1, SLC22A2
	16	q24.3		4/8	50%	ANKRD11, LOC101927817, SPG7, RPL13, SNORD68, CPNE7, DPEP1, CHMP1A, SPATA33, CDK10, SPATA2L, VPS9D1, VPS9D1-AS1, ZNF276, FANCA, SPIRE2, TCF25, MC1R, TUBB3, DEF8, CENPBD1, AFG3L1P, DBNDD1, GAS8, GAS8-AS1, URAHP, PRDM7



Por otro lado, analizamos los perfiles genómicos de expresión por grupo de edad. Encontramos que la ganancia con mayor recurrencia en adultos es la región 3p14 con una frecuencia del 100%. En cuanto a las pérdidas, la de mayor recurrencia es la 8p23.1 con una frecuencia de 87,5%, seguida de la región 16q24 (63%). Para el grupo de los jóvenes, se observó que las ganancias en las regiones 20q13.12 y 20p11.1 eran las de mayor recurrencia. Y las pérdidas en la región 19p13.1 se encontró en todos los pacientes (**Tabla 33**).

**Tabla 33.** Incidencia de las regiones focales en pacientes jóvenes y adultos con CaP.

		Regiones							
Nº de muestra		3p21.1 3p14	20p11.1	20q13.12	9q34.2	11q13.3	15q26.3	17q22 17q23.1	Xq12
GANANCIAS	40358	+	-	-	-	+	+	-	-
	40365	+	+	-	+	-	+	+	-
	40361	+	+	+	+	+	-	-	+
	40352	+	-	+	+	+	+	-	+
	40354	+	+	+	-	-	-	+	+
	40373	+	+	+	+	+	-	+	+
	40369	+	+	+	+	-	-	+	-
	40367	-	+	+	-	-	+	-	-
PERDIDAS	Nº de muestra	8p23.1 8p21.3	19p13.1	6q25.3	16q24.3				
	40358	+	+	-	-				
	40365	+	-	+	+				
	40361	+	-	+	+				
	40352	+	+	-	+				
	40354	-	-	-	-				
	40373	+	+	+	+				
	40369	-	+	+	-				
40367	-	+	-	-					
+: Presencia, -: Ausencia									

En este trabajo hemos analizado las regiones con pérdida de heterocigosidad con un tamaño superior a 3 Mb y 50 SNP, que comúnmente se encuentran enriquecidas con genes *driver* en el desarrollo tumoral, poniendo de manifiesto que la mayoría de los casos presentaban una región con LOH a nivel de 16p11 (87,5%). Además, se ha podido observar LOH a nivel de las regiones 10q11.21

(62,5%) y en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 7 y 11 (62,5 %) (Tabla 34).

**Tabla 34.** Regiones con LOH y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en los tumores de los pacientes con cáncer de próstata.

Cromosoma	Región		Casos	Frecuencia	Posibles genes implicados
16	p11.2	p11.1	7/8	87,5%	<b>FUS</b>
7	q11.21	q11.22	5/8	62,5%	GUSB, ASL, SBDS
11	p11.2	p11.12	5/8	62,5%	<b>DDB2</b> , KBTBD4, AGBL2, FOLH1, OR4C13
10	q11.21	q11.22	5/8	62,5%	RET, RASGEF1A, <b>MSMB</b>
1	p36.11	p35.3	4/8	50%	CNKSR1, ARID1A, WDC1, RAB42, YTHDF2
1	p33	p32.3	4/8	50%	CDKN2C, EPS15
3	q11.2	q11.2	4/8	50%	<b>EPHA6</b>
6	q21	q21	4/8	50%	REV3L
7	q34	q35	4/8	50%	BRAF, MGAM, PRSS1, EPHB6, TRPV6, TRPV5, KEL, OR9A2
8	p23.3	p23.2	4/8	50%	ARHGEF10, KBTBD11, MYOM2
8	p11.23	p11.21	4/8	50%	NSD3, FGFR1, TACC1
15	q15.2	q21.1	4/8	50%	TP53, BP1, B2M, C15orf48,
16	q22.1	q22.1	4/8	50%	CBFB, FHOD1, CTCF, ACD, EDC4, SLC7A6OS, CDH1, NFAT5
17	q11.1	q11.2	4/8	50%	LYRM9, TMEM199
17	q21.31	q21.32	4/8	50%	ETV4, KANSL1, CDC27
19	q13.2	q13.31	4/8	50%	PRX, SPTBN4, SHKBP1, LTBP4, SNRPA, CYP2A7, CD79A, POU2F2, ERF, CIC

Por otro lado, al analizar los pacientes por separado, observamos que en más del 50% de todos los casos existen LOH > 3Mb y los pacientes con más alteraciones son el 40367 y el 40369 (Tabla 35). Además, las regiones 7q11.22, 11p11.2 y 10q11.21 las encontramos en el 62,5% de los casos.

**Tabla 35.** Regiones con LOH alterados con mayor frecuencia en tumores con CaP.

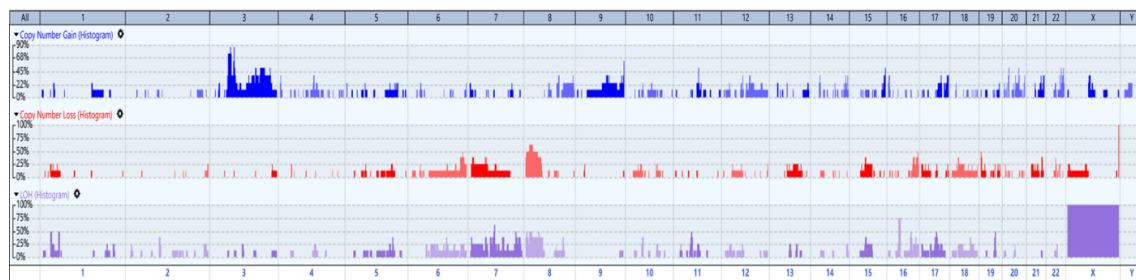
Nº de muestra	Regiones				
	16p11.2 16p11.1	7q11.21 7q11.22	11p11.2 11p11.12	10q11.21 10q11.22	3q11.2 3q11.2
40352	+	+	-	+	+
40354	-	+	+	-	-
40358	+	-	-	-	-
40361	+	+	+	+	-
40365	+	-	+	-	-
40367	+	+	+	+	+
40369	+	+	+	+	+
40373	+	-	-	+	+

+: Presencia, -: Ausencia

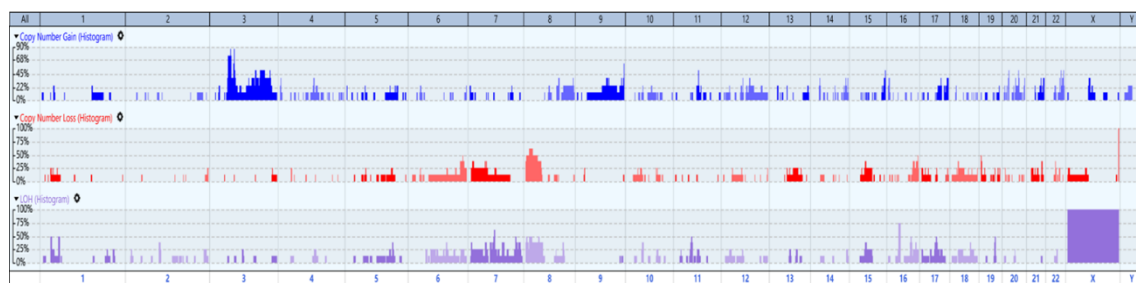
Debido a que el tamaño de muestra es muy pequeño, no se pueden obtener diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a la edad de los pacientes. Sin embargo, en los casos menores de 50 años, todos presentaban ganancias a nivel de 3p14.1 y 20q13.12, y pérdidas de material genómico a nivel de 19p13.

Además, se observó que en más del 50% de los casos existen LOH >3Mb en las regiones 16p11.2 (87,5%), 7q11.22 (62,5%), 11p11.2 (62,5%) y 10q11.21 (62,5%) (**Figura 41**).

**A)**



**B)**



Adultos



Jóvenes

**Figura 41.** Ideograma representativo de los tumores de CaP. **A)** Ideograma que representa la frecuencia de las alteraciones genómicas en todos los pacientes con cáncer de próstata obtenido mediante el programa de Nexus. **B)** Ideogramas comparativos de las alteraciones en adultos y jóvenes. Azul representa las ganancias, rojo las pérdidas y el morado las regiones de LOH.

## 4.2 Estudio de los genes implicados en la vía de señalización del AR mediante secuenciación masiva (NGS)

El estudio de mutaciones en los genes implicados en la vía del AR se llevó a cabo en 8 muestras procedentes de tumor embebido en bloque de parafina de pacientes diagnosticados con CaP, a los que previamente se les había analizado las alteraciones en el número de copias mediante la plataforma OncoScan. Las características clínicas de estos pacientes se encuentran en la **Tabla 5**. Antes de realizar el estudio se corroboró que todas las muestras cumplieran con los requisitos de calidad del DNA.

Las muestras se secuenciaron en un equipo Miseq de Illumina y se analizaron todas las variantes obtenidas mediante el software de análisis: VariantStudio Software Illumina™ 3.0 (Illumina, San Diego, CA). Para el análisis de los datos generados en la secuenciación, se contabilizaron las variantes que pasaron todos los filtros de calidad y se incluyeron sólo las variables que presentaron una frecuencia alélica superior al 10%.

### Análisis de los datos

El estudio por NGS permitió detectar 76 cambios en los tumores analizados, localizados en los diferentes genes incluidos en el panel. De todos ellos, 68 variantes corresponden con cambios neutrales, de los cuales 43 eran variantes intrónicas, 6 variantes sinónimas, 17 cambios en el extremo 3' UTR y otras dos, cambios en el extremo 5'.

En este estudio, no hemos considerado las variantes neutrales, ya que no afectan la estructura o función de la proteína y no tienen ningún efecto sobre la secuencia de aminoácidos, aunque no podemos descartar que modifiquen secuencias reguladoras de la maduración del RNA.

Hemos identificado un total de 5 mutaciones de tipo *missense*, 1 mutación de tipo *nonsense*, 1 mutación de tipo *frameshift* y 1 deleción *in-frame* (**Tablas 36 y 37**).

**Tabla 36.** Listado de variantes identificadas en los distintos genes implicados en la vía de AR.

Gen	SNP	Variante	Clasificación	Sift	Polyphen	Significado clínico
<b>SRD5A1</b>	rs248793	c.90C>G/ p.(Ala39Gly)	<i>Missense</i>	Benigna	Benigna	Benigna
<b>SRD5A2</b>	rs523349	c.265C>G/ p.(Leu89Val)	<i>Missense</i>	-	-	Desconocido
<b>SRD5A2</b>	rs142200057	c.89dupC/ p.(Pro31Ser31fsTer25)	<i>Frameshift</i>	-	-	Desconocido
<b>AR</b>	rs886039558	c.2257C>T/ p.(Arg753Ter)	<i>Nonsense</i>	-	-	<b>Patogénica</b>
<b>AR</b>	rs137852562	c.2323C>T/ p.(Arg775Cys)	<i>Missense</i>	Deletérea	Probablemente Patogénica	<b>Patogénica</b>
<b>AR</b>		c.404C>T/ p.(Pro135Leu)	<i>Missense</i>	Deletérea	Benigna	Desconocido
<b>AR</b>	rs78686797	c.170T>A/ p.(Leu57Gln)	<i>Missense</i>	Benigna	Desconocido	De tipo benigno
<b>AR</b>	rs1569265039	c.1368_1379del/ p.(Gly470_Gly473del)	<i>In-frame Deletion</i>	-	-	<b>Patogénica</b>

En la **Tabla 37**, mostramos el resumen de las variantes identificadas en los diversos tumores. Nuestros resultados son orientativos y están basados en predicciones bioinformáticas por lo que se requieren estudios funcionales y comprobación mediante PCR.

**Tabla 37.** Resumen de las variantes encontradas en las diferentes muestras de tejido tumoral.

Gen	Variante	Número de muestra							
		40352	40354	40358	40361	40365	40367	40369	40373
<b>SRD5A1</b>	c.90C>G/ p.(Ala39Gly)	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>SRD5A2</b>	c.265C>G/ p.(Leu89Val)	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>SRD5A2</b>	c.89dupC/ p.(Pro31Ser31fsTer25)	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>AR</b>	c.2257C>T/ p.(Arg753Ter)	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>AR</b>	c.2323C>T/ p.(Arg775Cys)	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>AR</b>	c.404C>T/ p.(Pro135Leu)	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>AR</b>	c.170T>A/ p.(Leu57Gln)	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>AR</b>	c.1368_1379del/ p.(Gly470_Gly473del)	-	-	+	-	-	-	-	-

+: Presencia, -: Ausencia

### Mutaciones de tipo *missense*

Las mutaciones *missense* son un tipo de mutación puntual en las que el cambio de nucleótido da como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente. Algunas de estas mutaciones pueden hacer que la proteína resultante no funcione de manera adecuada.

El paciente 40367 (44 años) estaba diagnosticado de un cáncer de próstata de bajo grado con un índice de Gleason de 6, un PSA de 9,15 ng/ml y no presentaba metástasis. En este paciente encontramos tres mutaciones de tipo *missense*:

1. La mutación **c.265C>G/p.(Leu89Val)**, localizada en el exón 2 en el gen *SRD5A2*, catalogada por los programas de predicción como benigna.
2. La mutación **c.404C>T/p.(Pro135Leu)**, localizada en el exón 1 en el gen *AR*, catalogada como de significado clínico desconocido.
3. La mutación **c.2323C>T/p.(Arg775Cys)**, localizada en el exón 6 del gen *AR*, catalogada como patogénica por los programas de predicción.

El paciente 40365 presentaba la mutación **c.170T>A/p.(Leu57Gln)**, localizada en el exón 1 del gen *AR*, que está catalogada como de tipo benigno. Este paciente fue diagnosticado con cáncer de próstata metastásico *de novo* a la edad de 63 años, con un índice de Gleason de 10, metástasis de tipo M1b y un nivel de PSA de 198,3 ng/ml.

### Mutaciones de tipo *frameshift* o cambio del marco de lectura

Las mutaciones con cambio del marco de lectura surgen cuando la secuencia normal de codones se interrumpe por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos, siempre que el número de nucleótidos agregados o eliminados no sea un múltiplo de tres.

En todos los pacientes incluidos en el estudio detectamos una mutación de tipo *frameshift* **c.89dupC/p.(Pro31Ser31fsTer225)**, localizada en el gen *SRD5A2*, catalogada como de significado clínico desconocido.

### **Mutaciones de tipo *nonsense***

Las mutaciones de tipo *nonsense* son las que generan un codón de parada prematuro y, por tanto, dan lugar a una proteína truncada. La mutación **c.2257C>T/p.(Arg753Ter)**, localizada en el exón 5 del gen *AR* está catalogada como patogénica y afecta la función de la proteína. Esta mutación la encontramos en el paciente 40358, diagnosticado con cáncer de próstata metastásico *de novo* a la edad de 84 años con un Gleason de 8 y unos niveles de PSA de 1374 ng/ml y una metástasis de tipo M1b.

### **Mutaciones de tipo *in-frame***

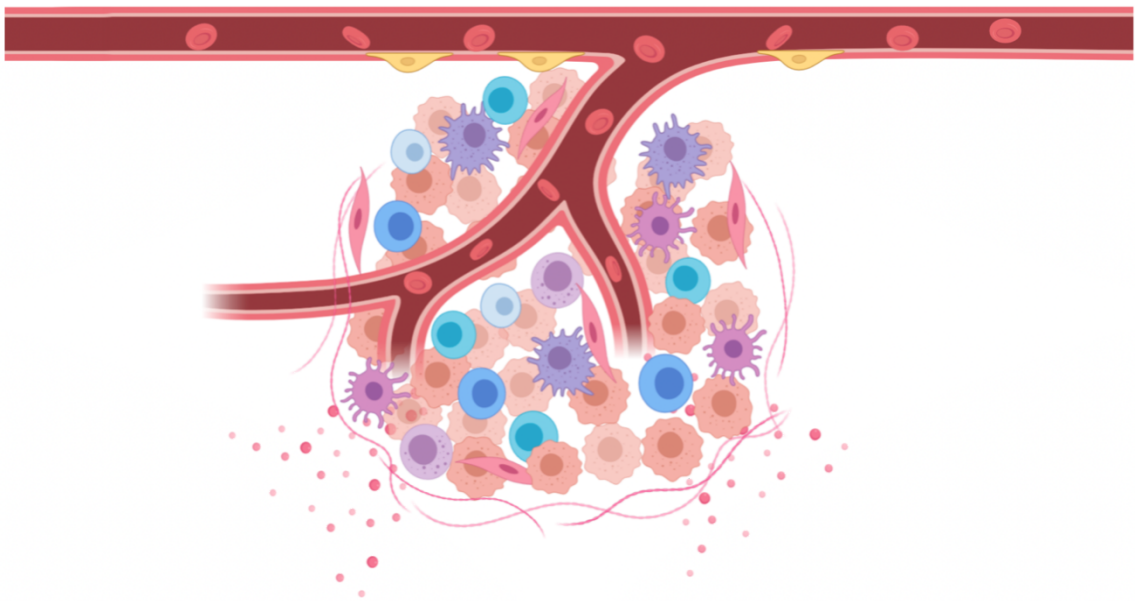
Una deleción de tipo *in-frame* puede dar lugar a una proteína que carece de uno o más aminoácidos. Esto con frecuencia altera la estructura terciaria de la proteína y, como resultado, o no se secreta o, si lo hace, se elimina rápidamente de la circulación.

En el paciente 40358 encontramos una deleción de tipo *in-frame* **c.1368\_1379del/p.(Gly470\_Gly473del)**, que se encontraba localizada en el exón 1 en el gen *AR*. Está catalogada como de significado clínico desconocido según la plataforma Varsome y tiene una frecuencia poblacional del 0,000023%.





# Discusión





## **Estudio del mRNA del gen *AR* y sus variantes mediante RT-PCR en células mononucleadas de sangre periférica**

El cáncer de próstata es el tumor más común en los varones y una de las principales causas de muerte por cáncer. Desde que Huggins y Hodges demostraron por primera vez la capacidad de respuesta del CaP a la privación de andrógenos (Huggins & Hodges, 1941), ha quedado claro que el cáncer de próstata depende de la activación del AR para su crecimiento y supervivencia (Davey & Grossmann, 2016).

La enfermedad metastásica es la principal causa de muerte asociada al cáncer de próstata. Los ganglios linfáticos adyacentes a los tumores primarios suelen ser el primer sitio de metástasis, seguidos de metástasis en el hígado, los huesos y los pulmones. Para metastatizar, las células de cáncer de próstata realizan la transición epitelio-mesénquima (EMT), tras lo cual se diseminan en la circulación y superan varias barreras antes de establecerse en el nuevo tejido.

La caracterización molecular y fenotípica de biomarcadores de origen tumoral circulantes en sangre periférica (biopsia líquida) permite su utilización como método de diagnóstico, permitiendo la identificación de fenotipos relacionados con el estadio inicial, la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento.

AR es un receptor nuclear de tipo esteroideo, que es activado por hormonas androgénicas como la testosterona y la DHT. AR se activa por fosforilación-dimerización y se transloca desde el citoplasma al núcleo. Diversos estudios sugieren que la progresión del cáncer de próstata ocurre a través de la alteración del eje androgénico normal por desregulación de la actividad de AR a través de cascadas de transducción de señales, alteración en la expresión tanto de correguladores y mutaciones que le permiten volverse transcripcionalmente activo en respuesta a otros ligandos además de testosterona y DHT (Heinlein & Chang, 2004).

El gen que codifica el receptor de andrógenos (*AR*), se caracteriza porque, además del transcrito completo (*AR-FL*), presenta transcritos alternativos (*ARV*) (Antonarakis et al., 2014). Las variantes del receptor de andrógenos *ARv567* y *ARv7* son las variantes de *splicing* más prevalentes clínicamente y se encuentran constitutivamente activas. Algunos estudios sugieren que, dependiendo del contexto celular, estas variantes necesitan la presencia de *AR-FL* para ejercer sus funciones (Xu & Qiu, 2016). Aunque se ha demostrado que las *AR-V* desempeñan papeles importantes en la progresión del CaP ya que pueden regular los genes diana de *AR* o genes relacionados con el ciclo celular, todavía se debate si las *AR-V* tienen funciones distintas o simplemente sirven como sustitutos de *AR-FL* en condiciones de depleción de andrógenos (Hu et al., 2009; Watson et al., 2010).

La mayoría de estos *AR-V* mantienen el dominio de transactivación en el extremo N-terminal y un dominio de unión al DNA intactos, seguidos de un péptido corto, específico de cada variante, que reemplaza al dominio LBD en el extremo C-terminal. Las variantes de maduración ("*splicing*") del gen *AR* se han asociado con el desarrollo de resistencia a la ADT en el cáncer de próstata, siendo *ARv7* y *ARv567*, los más estudiados y clínicamente significativos (Ware et al., 2014).

Las *AR-V* pueden regular un subconjunto de genes de fase M y vincularse con diferentes mediadores. La enzima conjugadora de ubiquitina E2-C (*UBE2C*) es uno de los genes del ciclo celular que está regulado por *ARv7* en condiciones de depleción de andrógenos (B. Cao et al., 2014; Hu et al., 2012). También, se ha demostrado que la proteína mediadora de la transcripción de la subunidad 1 de la RNA polimerasa (*MED1*) y *ARv567* ocupan parte de las regiones reguladoras de los genes *UBE2C* y promueven su expresión independiente de andrógenos (Liu et al., 2015).

Las variantes de *AR* no sólo son responsables de la resistencia a la ADT, sino que también pueden asociarse con resistencia a taxanos (paclitaxel, docetaxel, etc) (De Bono et al., 2010).

Se ha visto que la sobreexpresión de las variantes de AR, contribuyen a la metástasis y la progresión a un fenotipo más agresivo mCRPC al promover el proceso de transición epitelio mesénquima y adquirir propiedades de células madre (Ellis et al., 2014; Xu & Qiu, 2016). Además, es posible que la resistencia a fármacos se desarrolle a partir de una subpoblación que contiene un alto nivel de AR-V que ya están presentes en el tumor antes del tratamiento o que las AR-V tengan una vía alternativa que sea capaz de evadir el mecanismo de acción farmacológico, ejerciendo así su función sobre la proliferación celular y metástasis (Holohan et al., 2013).

La detección de AR-FL o sus variantes ARv7 y ARv567 en sangre periférica puede hacerse a partir de células tumorales circulantes (CTC), de RNA circulantes (ctRNA) o de exosomas. Nosotros hemos estudiado la presencia de transcritos del gen *AR* (*AR-FL*, *ARv567* y *ARv7*) mediante RT-PCR, a partir de RNA obtenido de células nucleares circulantes de 20 pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*”. No hemos detectado el transcrito completo (*AR-FL*) ni la variante *ARv7* en ninguno de los casos, pero en tres pacientes encontramos la variante *ARv567* en las células circulantes. Estos pacientes presentaban un índice de Gleason >8 y entre 14 y 16 metástasis, siendo dos de los pacientes con más metástasis dentro del grupo de estudio (**Tabla 17**).

Aunque la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta el momento se han centrado en el estudio de expresión de *AR* y sus variantes en CTCs o ctRNA (Hodara et al., 2019), nuestros resultados confirman la posibilidad de detectar biomarcadores tumorales en células mononucleares de sangre periférica sin hacer selección previa de CTCs como había sido previamente descrito en otros trabajos (Marín-Aguilera et al., 2015).

La detección de RNA del gen *AR* en tres casos con un elevado número de metástasis sugiere la presencia de un elevado número de CTCs; no obstante, al ser un estudio retrospectivo desconocemos el número de CTCs de cada paciente, por lo que no podemos extraer conclusiones definitivas. Es conocido que *AR-FL* y *ARv7* siguen programas de transcripción diferentes, aunque la expresión de *ARv7* está acoplada con la de *AR-FL* dado que este receptor

puede funcionar de manera autocrina, principalmente en células de cáncer de próstata resistente a castración (Zhu & Luo, 2020).

La detección de ARv567 en ausencia de ARv7 está poco estudiada, pero puede ser debida a que los tratamientos previos de los pacientes puedan desequilibrar la transcripción alternativa del gen *AR*.

### **Estudio de la expresión de las proteínas AR-FL y ARv7 en plasma mediante la técnica de Simple West**

El western blot (WB), la técnica “estándar de oro” para la caracterización de proteínas, tiene un bajo rendimiento, requiere una gran cantidad de tiempo, arroja datos semicuantitativos de poca repetitividad y no siempre es posible obtener la cantidad de proteína requerido en muestras de pacientes con cáncer (Misiewicz-Krzeminska et al., 2018). Por esta razón, empleamos la técnica de Nanoimmunoensayo Capilar Automatizado, que nos permite medir la expresión de proteínas en pequeñas cantidades de muestra y tiene una mayor sensibilidad y reproducibilidad que el western normal.

La producción y el mantenimiento de las proteínas celulares requiere una serie notable de procesos vinculados, que van desde la transcripción, procesamiento y degradación de los mRNA, hasta la traducción, localización, modificación y destrucción programada de las mismas. Se ha visto que los niveles de expresión del mRNA sólo reflejan una fracción en la cantidad de proteínas celulares (Vogel & Marcotte, 2012).

A partir del estudio realizado en plasma de 42 pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*” por la técnica de Simple West, observamos la presencia de AR en 39 (92,86%) pacientes no detectándose en ningún individuo sano. Estos datos se relacionaron con las características clínicas, observando que los pacientes AR-FL+ presentaban mayoritariamente un índice de Gleason de alto grado, con metástasis de tipo M1b. Estos resultados confirman los de otros trabajos previos realizados con otros métodos, como el estudio de Lyn et al., en el que compararon el nivel de expresión de la proteína AR-FL en muestras de

56 pacientes con CaP sin tratamiento, mediante tinción inmunohistoquímica, mostrando que los tumores de próstata con puntuaciones de Gleason más altas antes del tratamiento expresaban más proteína de AR (C. Y. Lin et al., 2018). La ausencia de expresión de AR-FL en 3 pacientes puede ser debido a que los niveles de la proteína estuviesen por debajo del nivel de detección con nuestra técnica, ya que el mRNA de AR-FL sea más inestable o a que la proteína se degrade más fácilmente en el proteasoma (Heinlein & Chang, 2004; Jaworski, 2006).

De los 42 pacientes incluidos en nuestro trabajo, detectamos la isoforma ARv7 en el plasma de 14 (33,33%). En un estudio previo de nuestro grupo se estudió la expresión de ARv7 en 72 pacientes con CaP con la técnica de Simple West, encontrando expresión de ARv7 en el 29% de los pacientes con CRPC y CaP metastásico. Al correlacionar los parámetros clínicos observaron niveles de PSA elevados en el grupo de pacientes ARv7+ y un índice de Gleason de alto grado (García et al., 2017).

Por otro lado, en nuestro estudio no hemos encontrado correlación entre la presencia de ARv7 con tumores más agresivos; sin embargo, se observó que el grupo de pacientes que presentaban ARv7 tenían una menor supervivencia global con una tendencia a la significación (Antonarakis et al., 2014) (**Figura 30**). En un trabajo reciente, en el que estudiaron la expresión de la proteína ARv7 nuclear en tumores de pacientes con CaP, se observó que la sobreexpresión del transcrito ARv7 se asociaba con un pronóstico desfavorable y características de crecimiento más agresivas en los tumores (X. Chen et al., 2018). Estos datos confirman que la expresión de la isoforma de ARv7 está relacionada con un peor pronóstico y una menor supervivencia global, debido probablemente a que la proteína de ARv7 está truncada y carece de dominio de unión al ligando, lo que le confiere una constante actividad transcripcional, promoviendo la resistencia a ADT.

### **Estudio de circAR en sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata metastásico “de novo”**

Los circRNA son una clase de RNA no codificante, que representan hasta el 10% del total de RNA en las células humanas. Los circRNA se expresan abundantemente, se secretan en la circulación y son detectables en plasma y orina (Bach et al., 2019).

A diferencia de los mRNA, los circRNA tienen mayor estabilidad al ser moléculas cerradas covalentemente que contienen secuencias de exones y/o intrones. Son sintetizados por la misma maquinaria del spliceosoma de RNA que los RNA mensajeros. Se ha visto que la expresión desregulada de los circRNA está asociada con diversas enfermedades, incluidos muchos tipos de cáncer.

Aunque el papel de los circRNAs en el cáncer aún no se conoce por completo, estudios recientes sugieren que pueden unirse a proteínas de unión a RNA, traducir péptidos y conferir resistencia al tratamiento. Su alta abundancia y estabilidad en comparación con los mRNA, le confiere un papel potencial como biomarcador a partir de biopsia líquida.

Los transcritos alternativos de mRNA del gen *AR* son biomarcadores de mal pronóstico en el CRPC (Luo et al., 2019). Recientemente se han caracterizado 13 circRNA derivados de *AR* en pacientes con CRPC cuya expresión se incrementa de manera paralela a la del *AR-FL* y *AR-V* durante la generación de la resistencia al tratamiento. Al ser más resistente a la degradación en sangre periférica podrían ser mejores marcadores que la detección de *AR-FL* o *AR-V* en biopsia líquida (S. Cao et al., 2019).

En nuestro trabajo detectamos 26 pacientes (61,90%) que presentaban niveles altos de expresión de circAR en plasma, no encontramos diferencias significativas al correlacionarlo con las características clínicas; sin embargo, todos los pacientes presentaban un índice de Gleason alto (**Tabla 20**).



Por otro lado, al correlacionar los niveles de expresión de circAR y el *AR-FL* en plasma de los 42 pacientes, encontramos que 13 pacientes presentaban niveles altos de expresión de ambos (**Tabla 29**). De esos 13 pacientes, 6 (16,17,19, 22, 23, 32) estaban relacionados con altos niveles de expresión de *AR-FL/ARv7/Arv567* en plaquetas circulantes. En un estudio previo, se ha visto que los niveles de circAR se correlacionaron fuertemente con los niveles de *AR-FL* (así como de sus variantes), tanto en muestras clínicas como en xenoinjertos derivados de pacientes (S. Cao et al., 2019). Otro grupo, estableció una fuerte correlación entre circARs y las AR-Vs en tejidos de pacientes con mCRPC, ya que el *backsplicing* de los circAR y el *splicing* alternativo de las AR-V, pueden estar vinculados mecánicamente y/o con la biogénesis de los circAR que posiblemente medien el empalme de los AR-V y viceversa (Vo et al., 2019).

Nuestros resultados indican que los pacientes que presentan altos niveles de expresión de circAR están asociados con una mayor mortalidad y una menor SG. No existen estudios previos que nos permitan comparar nuestros resultados, por lo que planteamos estudiar una serie más larga para confirmar estos resultados preliminares.

### **Estudio del gen *AR* y sus variantes en plaquetas circulantes de pacientes con cáncer de próstata metastásico “*de novo*”**

Las plaquetas son un componente fundamental del microambiente tumoral y sirven como cooperadores locales y sistémicos tanto durante el inicio del desarrollo tumoral como en el proceso de metástasis, por lo que quedan expuestas a la “educación plaquetaria” mediada por el tumor (TEP). Las células tumorales pueden, directa e indirectamente, imponer cambios en el contenido de RNA y proteínas de las plaquetas. Por esta razón, el RNA de las TEPs, surge como un nuevo biomarcador a partir de biopsia líquida (Xing et al., 2019).

Se ha postulado que las plaquetas desempeñan una función crítica en el CaP, aunque esta interacción sigue siendo poco conocida. Sin embargo, las plaquetas pueden favorecer la progresión tumoral al liberar localmente factores de crecimiento y al proteger a las células tumorales circulantes frente a la vigilancia inmunitaria.

También, se ha demostrado que las plaquetas producen dihidroepiandrosterona, que puede ser precursor de andrógenos y estrógenos (Garrido et al., 2012), lo que aumenta la posibilidad de un mecanismo adicional a través del cual las plaquetas podrían favorecer el crecimiento del CaP (Zaslavsky et al., 2015).

Nosotros hemos analizado los perfiles de expresión del gen *AR* en 42 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico *de novo* y 16 sujetos sanos a partir de RNA obtenido de plaquetas circulantes. El receptor más abundante en la superficie plaquetaria es *ITGA2B*, por lo que lo incluimos en nuestro estudio como marcador plaquetario. Al analizar los niveles de expresión del gen *ITGA2B*, observamos que 13 pacientes (30,95%) presentaban alta expresión de este gen en relación con el grupo control.

### ***ITGA2B***

Se sabe que en la membrana plaquetaria están incrustadas una gran cantidad de moléculas de adhesión, incluidas integrina, selectinas, glicoproteínas ricas en leucina y proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas. Estas moléculas promueven la adhesión plaquetaria no sólo a las propias plaquetas y a la pared del vaso, sino también a otros tipos de células, incluidas las células cancerosas (N. Li, 2016). Se ha sugerido que tanto la integrina GPIIb/IIIa como el receptor de vitronectina de tipo integrina ( $\alpha v\beta 3$ ) están involucrados en promover la metástasis en células de cáncer de mama (MDA-MB-231), lo que parece reforzar la idea de que se produce una interacción entre células cancerígenas y plaquetas (Cohen et al., 2000; Zhao et al., 2014).

Además, se ha estudiado la expresión de *ITGA2B* en otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Xing et al., 2019) y el cáncer de células renales (X. Lu et al., 2016), ambos estudios muestran que niveles elevados de expresión de *ITGA2B* se asocian con una menor supervivencia global.

En nuestro estudio hemos comprobado que los pacientes con altos niveles de expresión de *ITGA2B* presentaban una mayor mortalidad y una peor supervivencia global. Debido a que nuestros pacientes presentan metástasis *de novo* al diagnóstico, las plaquetas podrían estar fuertemente involucradas en este proceso, ya que se encargan de proteger a las células cancerosas de su eliminación (Zhao et al., 2014). Esta es la primera vez que se describe la expresión de *ITGA2B* con una peor SG en CaP, por lo que podría considerarse como un marcador pronóstico.

### ***AR-FL***

En el análisis de los niveles de expresión de *AR-FL* en plaquetas de los pacientes incluidos en nuestro trabajo encontramos que 23 (54,76%) presentaban expresión elevada. Se ha visto que *AR-FL* puede identificarse tanto en megacariocitos como en plaquetas y que este AR activa otros genes sensibles a andrógenos involucrados en la modulación de la actividad plaquetaria (Khetawat et al., 2000).

Otros grupos han analizado los niveles de expresión de *AR-FL* en tumores de próstata primarios y en metástasis, encontrando que un aumento de expresión se asociaba con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad (Mohler et al., 2004) y con tumores más agresivos (C. Y. Lin et al., 2018). Sin embargo, en nuestro trabajo no hemos encontrado relación entre los niveles de *AR-FL* en plaquetas y la supervivencia de los pacientes, lo que podría reflejar que los niveles de expresión tisular no se correlacionan con los plaquetarios. Son necesarios más estudios para determinar la utilidad de *AR-FL* en plaquetas circulantes.

### **ARv7 y ARv567**

En nuestro estudio hemos detectado alta expresión de *ARv7* en plaquetas de 28 pacientes (66,66%) que también presentaban un PSA elevado al diagnóstico (**Tabla 24**). En otros estudios se ha encontrado que altos niveles de expresión de *ARv7* en pacientes con CaP metastásico *de novo* y en pacientes con CRPC se correlacionan con altos niveles de PSA y resistencia al tratamiento (Caffo et al., 2016; Nimir et al., 2019; T. Zhang et al., 2020). Además, también se ha comunicado la detección en más del 95% de los pacientes de niveles elevados de expresión de *ARv7* en células mononucleares, asociándose con una pobre respuesta a tratamiento con fármacos inhibidores (Galletti et al., 2017). No obstante, ninguno de estos estudios ha abordado la detección en plaquetas circulantes.

En nuestro trabajo, el grupo con mayor expresión de *ARV7* presentaba una mayor mortalidad en comparación con el grupo de baja expresión, aunque sin alcanzar la significación (**Figura 38**). Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de altos niveles de expresión de *ARv7* plaquetario podrían estar relacionados con la supervivencia y que el estudio de plaquetas circulantes podría ser una alternativa viable para detectar la expresión de *ARv7* en pacientes con CaP.

La isoforma *ARv567* ha ganado interés debido a su estructura proteica única. En particular, la presencia de una región de bisagra intacta, en contraste con la mayoría de las otras variantes del AR. Esta variante contiene todo el dominio de unión al DNA y la secuencia de localización nuclear, siendo constitutivamente activa y, al igual que *ARv7*, puede funcionar en ausencia de ligando.

*ARv567* se encuentra presente en el 59% de las muestras tumorales en pacientes con CRPC. En nuestro trabajo hemos analizado la expresión de *ARv567* en plaquetas circulantes, encontrando que 24 pacientes (57,14%) presentaban alta expresión de la variante. También observamos que los pacientes con altos niveles de expresión de *ARv567* presentaban una

supervivencia global más baja (62,5%) que los pacientes con baja expresión (38,89%).

El hueso es el sitio principal donde se disemina el CaP metastásico (Xu & Qiu, 2016). Un estudio previo demostró que las variantes de AR (ARv7 y ARv567) aumentan en la metástasis ósea de CaP y se asocian con peor pronóstico (Hörnberg et al., 2011). En nuestro trabajo hemos encontrado una ausencia de metástasis tipo M1a y una mayor incidencia de M1b en el grupo de mayor expresión de *ARv567*. Además, encontramos una mayor supervivencia, aunque no significativa, en el grupo que no expresan *ARv567*.

A la vista de estos resultados, realizamos un análisis comparativo entre los pacientes que presentaban niveles altos de expresión plaquetaria de estas dos variantes (*ARv7+/ARv567+*) y los que presentaban niveles normales de normal (*ARv7-/ARv567-*). Los 17 pacientes que presentaban altos niveles de expresión de *ARv7+/ARv567+* tenían también niveles de PSA elevado y menor supervivencia global (**Figura 40**). Esto concuerda con los datos de un estudio previo, en CTC, realizado en pacientes con CaP metastásico, en el que encuentran que la ausencia de ambas variantes se asocia con una mayor supervivencia y mejor respuesta al tratamiento (Tagawa et al., 2019). Sin embargo, esta es la primera vez que se estudian ambas variantes a partir de RNA de plaquetas.

Múltiples mecanismos pueden estar implicados en la sobrerregulación de las AR-V durante la progresión de los CaP dado el alto grado de complejidad y heterogeneidad tanto a nivel morfológico como molecular (Boyd et al., 2012), por lo que es necesario seguir realizando estudios más a fondo sobre la actividad de las AR-V para determinar su acción en la supervivencia y la resistencia a fármacos.

### **Análisis de las alteraciones citogenéticas en tumores de próstata**

Las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo y progresión del CaP no se conocen completamente (Setlur et al., 2007). Para contribuir a un mejor conocimiento de estas alteraciones, hemos analizado 8 tumores de pacientes con CaP mediante aCGH.

Los tumores incluidos en el estudio se agruparon de acuerdo con la edad al diagnóstico mayores (5/8) y menores de 50 años (3/8). Las diferencias que se observaron a nivel cromosómico como ganancias se localizan principalmente en 3p (87,5%), 20p-20q (75%) y Xq (50%), siendo estas las de mayor recurrencia. En cuanto a las pérdidas, se encuentran principalmente en 8p (62,5%), 19p (62,5%), 6q y 16q (50%).

Las ganancias en Xq y las pérdidas en 6q, 8p y 16q son alteraciones recurrentes en el CaP (Saramäki et al., 2006). Las pérdidas en 6q, 8p y 13q parecen ser eventos tempranos, que se encuentran también en la PIN. Por otro lado, la ganancia de Xq se encuentra especialmente en los carcinomas de próstata resistentes al tratamiento hormonal (Porkka & Visakorpi, 2004).

La ganancia en la región 3p21.1, donde se encuentra el gen del Factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*), es la alteración más frecuente en nuestra serie (7/8). *MITF* es un factor de transcripción que regula programas de compromiso de linaje que son esenciales para la propagación de los melanocitos (Wellbrock & Arozarena, 2015). *MITF* por sí solo no puede actuar como un oncogén clásico, por lo que se le ha denominado "oncogén de supervivencia de linaje" para el melanoma (Garraway et al., 2005). Las variantes de *MITF* son el resultado tanto del *splicing* alternativo como de la activación del promotor (Tachibana, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que en el CaP la expresión de *MITF* está regulado positivamente por *CRYAB* (B Alfa Cristalina), esta asociación genera una reducción en la proliferación celular y la replicación del DNA. *CRYAB* funciona como una chaperona molecular inducida por el estrés, inhibe la agregación de proteínas desnaturalizadas, promueve la supervivencia celular e inhibe la apoptosis en el

contexto del cáncer; sin embargo, en el CaP y en el nasofaríngeo, la expresión de *CRYAB* está disminuida (Valcarcel-Jimenez et al., 2018). Estos datos sugieren que el eje MITF-*CRYAB* ejerce actividad supresora de tumores y podría ser un nuevo biomarcador en el CaP.

Otra de las ganancias observadas con mayor recurrencia se encuentra en la región 20p11.1. En esta región se encuentra el gen *MACROD2* (Mono-ADP ribosilhidrolasa 2), las deleciones o SNP en este locus se han asociado a menudo con progresión tumoral, trastornos neurológicos y psiquiátricos. Además, las alteraciones del gen que codifica *MACROD2*, se ha asociado con el síndrome de Kabuki, un trastorno congénito pediátrico caracterizado por anomalías faciales y retraso mental (Maas et al., 2007; Kuniba et al., 2008).

Se ha comunicado que las deleciones frecuentes de *MACROD2* alteran la reparación del DNA, lo que resulta en inestabilidad cromosómica y tumorigénesis colorrectal (Lo Re et al., 2018). En los cánceres de mama primarios y en las metástasis, la expresión de *MACROD2* puede cambiar con la evolución de la enfermedad. El aumento de la expresión y amplificación de *MACROD2* en los tumores primarios se asocia con una peor supervivencia (Mohseni et al., 2014). Estos estudios sugieren que *MACROD2* puede actuar como un mediador clave del crecimiento, independiente de los estrógenos, y en la resistencia al tamoxifeno, siendo un nuevo objetivo potencial para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama.

*MACROD1* está implicado en la modulación de la señalización del AR y del ER (J. Yang et al., 2009). Estudios recientes sugieren que el locus que abarca el gen *MACROD2* en el cromosoma 20p12.1 puede ser un sitio frágil específico del cáncer que favorece las deleciones somáticas (Mohseni et al., 2014).

La región con mayor recurrencia de pérdidas en nuestra serie es 8p23 (62,5%). En esta región se encuentra el gen *MSR1* (Receptor 1 del eliminador de macrófagos). El cromosoma 8p ha recibido gran importancia porque comúnmente se elimina en el CaP, así como en muchos otros cánceres, incluidos el de cabeza y cuello, colon, mama, ovario, hígado, pulmón y vejiga (Hsing et al., 2007). Además, los resultados de múltiples estudios evidencian que el cromosoma 8p puede albergar genes importantes de susceptibilidad al CaP. Varios genes candidatos en 8p están involucrados en el desarrollo del CaP, incluidos la proteína homeobox *Nkx-3.1* (*NKX3.1*), el candidato supresor de tumores 3 (*N33*), *MSR1* y el gen deleciónado en cáncer de hígado 1 (*DLC1*) (B. L. Chang et al., 2007).

Dada la naturaleza del receptor, el gen *MSR1* está involucrado en varios procesos biológicos, incluida la inmunidad innata y adaptativa, la inflamación y la apoptosis (Sun et al., 2006). Como componente importante en la vía de la inflamación, el gen *MSR1* puede vincular la inflamación crónica y el CaP al alterar las respuestas de inflamación tras la unión de una amplia gama de ligandos. En resumen, se sugiere que el gen *MSR1* no confiere un riesgo importante de cáncer de próstata, pero puede conferir un riesgo moderado.

En la región 8p21.3, también se encuentra el gen *DLC1*, que codifica una proteína activadora de Rho GTPasa con función supresora de tumores. La inactivación del gen *DLC1* se produce por deleción o por metilación aberrante del promotor. Las alteraciones del gen *DLC1*, por deleción o por hipermetilación de la región promotora, suponen una pérdida de la actividad supresora de tumores en el cáncer de próstata, habiéndose indicado que podría aumentar el riesgo de metástasis (Guan et al., 2006).

En el cáncer de próstata, la pérdida de LOH de las regiones cromosómicas es crucial en la progresión del tumor. Se han identificado varias regiones cromosómicas que demuestran una alta frecuencia de LOH en los cromosomas 1p, 3p, 5q, 7q, 6q, 8p, 8q, 10q, 11p-q, 13q, 16q, 17p, 17q y 18q (Dumur et al., 2003).



En nuestra serie la mayoría de los casos presentaban LOH a nivel de 16p11.2 (87,5%), 10q11.21 y de las regiones pericentroméricas de los cromosomas 7 y 11 (62,5 %).

En la región 16p11.2 se localiza el gen *FUS*, que codifica una proteína multifuncional que consiste en un complejo de ribonucleasa heterogénea nuclear (hnRNP) (Kwiatkowski et al., 2009). Este complejo, participa en la interacción con el pre-mRNA y el traslado del mRNA al citoplasma. *FUS* interacciona con los dominios de unión de DNA de los receptores de retinoides X, receptores de estrógeno, tiroideos y glucocorticoides (Powers et al., 1998). También se ha demostrado que este gen tiene un sitio de transferencia que es funcionalmente activo en las células del cáncer de próstata. Se ha visto que la expresión de *FUS* disminuye en la etapa avanzada del cáncer de próstata y, por lo tanto, la pérdida de *FUS* puede aumentar la señalización de andrógenos y, favorecer la proliferación de las células del cáncer de próstata. Sin embargo, el aumento de la expresión de *FUS* reduce el crecimiento tumoral y previene la etapa G1, aumentando la apoptosis en las células del cáncer de próstata. Por todo ello, el gen *FUS* podría ser importante al generar un vínculo entre la señalización de andrógenos y la progresión del ciclo celular (Ghanbarpanah et al., 2018).

En la región 11p (11.2-11.12), se localiza el gen *DDB2* que codifica la proteína de unión al DNA dañado 2. Esta es una proteína que se une al DNA dañado, asociado a la proteína de unión al DNA dañado 1 (*DDB1*) y al gen cullin-4 (*CUL4*). Un estudio demuestra que *DDB2* es una proteína que interactúa con AR y media el contacto con AR y el complejo CUL4A-DDB1 para la ubiquitinación y degradación del receptor (S. W. Chang et al., 2012). El daño del DNA induce la expresión génica tanto de *TP53* como de *DDB2*, pudiendo inhibir la expresión de *AR*. *DDB2* tiene una función de importación nuclear y puede llevar *DDB1* al núcleo para la reparación del DNA y la regulación del ciclo celular. *DDB2* juega un papel en el proceso de envejecimiento normal y la prevención del cáncer. Se ha demostrado que este gen está involucrado en la degradación de la proteína de AR, sugiriendo una actividad como supresor de tumores en CaP (Itoh, et al., 2007).

En la región 10q11.21 se sitúa el promotor del gen *MSMB* que codifica la microseminoproteína-beta, proteína del líquido seminal que se ha encontrado regulada negativamente en el CaP (Pomerantz et al., 2010). Además, se ha caracterizado *MSMB* como un gen supresor de tumores y cuando se encuentra en niveles bajos, se asocia con formas más agresivas de CaP (Rinckleb et al., 2012).

En el cromosoma 3q11.2 se localiza el gen del receptor 6 de efrina tipo A (*EphA6*). Los receptores efrina (Ephs) representan la mayor familia de receptores de tirosina quinasa. Diversos estudios indican que Ephs y sus ligandos de efrina están involucrados en diferentes procesos relacionados con la metástasis, incluida la adhesión, migración, invasión y angiogénesis. Entre los Ephs y efrinas, *EphA6* se sobreexpresa constantemente en las células CaP metastásicas (S. Li et al., 2015). La expresión de *EphA6* es alta en los tejidos tumorales de CaP, mientras que es casi indetectable en los tejidos adyacentes no tumorales. Se ha observado que *EphA6* se sobreexpresa en muestras de tejido tumoral pero no en tejido benigno de pacientes con BPH. *EphA6* se ha considerado como un gen de metástasis que se correlaciona positivamente con la progresión de CaP.

En resumen, el estudio de CNAs mediante *microarrays* genómicos nos ha permitido encontrar diferencias a nivel genómico, entre los grupos de estudio jóvenes y adultos. En las regiones alteradas de manera diferencial hemos encontrado genes implicados tanto en el desarrollo de CaP como en la metástasis. No obstante, es necesario estudiar una serie más amplia para poder sacar conclusiones.

### **Estudio de los genes implicados en la vía del AR mediante NGS**

La metodología NGS, ha revolucionado la investigación genómica, permitiendo la secuenciación de una gran cantidad de genes a partir de DNA o RNA. Se ha demostrado que la detección de mutaciones tiene una sensibilidad de aproximadamente el 95% y una especificidad del 100% para una variedad de alteraciones como SNP, inserciones y deleciones, mutaciones de tipo *splicing* y deleciones macroscópicas (Rubio et al., 2020).

La interpretación de cada resultado en las pruebas NGS es compleja, ya que, al secuenciar una mayor cantidad de genes, se pueden evidenciar un mayor número de variantes genéticas incidentales que no presentan significado conocido. La mayoría de estas variantes desconocidas pueden no conceder riesgo en un individuo sano, pero también existe la posibilidad de que sea una nueva variante patogénica (O’Roak et al., 2011). Se ha reportado que, en un individuo sano, sólo el 60% de las mutaciones encontradas tiene probabilidades reales de asociarse a enfermedad (Lam et al., 2012).

En nuestro trabajo diseñamos un panel específico para el análisis de genes que están implicados en la vía de AR (*SRD5A2*, *SRD5A1*, *NR3C1*). Se incluyeron un total de 8 muestras procedentes de tumor en bloque de parafina de pacientes diagnosticados con CaP, a los que se les analizó previamente las CNVs mediante la plataforma OncoScan™.

Para el análisis de datos, en nuestro trabajo sólo se contabilizaron las variantes que cumplían con los filtros de calidad según los programas de predicción y se incluyeron las variantes que presentaron una frecuencia alélica superior al 10% en el tumor. Por otro lado, las variables que no cumplían con estos requisitos no fueron incluidas en el estudio.

La síntesis de andrógenos intratumorales se ha identificado como uno de los mecanismos que adoptan las células de CaP para activar la señalización de AR en presencia de niveles de castración de andrógenos circulantes. Varias enzimas esteroideogénicas están involucradas en este proceso y el perfil de expresión de estas moléculas podría encontrarse alterado en el CRPC, con sobreexpresión de enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos como es el caso de *SRD5A1* y en la inactivación de andrógenos como *SRD5A2* (Galletti et al., 2017).

De las 76 variantes identificadas en este estudio, 68 variantes corresponden a cambios neutrales (**Tabla A-1**). De las cuales 43 son variantes intrónicas, 6 variantes sinónimas, 17 cambios en el extremo 3' UTR y dos en el extremo 5'.

Todas estas variantes no fueron consideradas en el estudio posterior ya que no afectaban la estructura o función de la proteína; sin embargo, en una segunda fase se analizará si existen alteraciones en secuencias reguladoras de *splicing*.

Además, hemos identificado 5 mutaciones de tipo *missense*: una de ellas estaba clasificada por los programas de predicción como patogénica; una mutación *frameshift*, una delección *in-frame* y una mutación de tipo *nonsense* catalogadas como patogénicas (**Tabla 36**).

El gen en el que identificamos un mayor número de mutaciones fue *AR* (5 mutaciones), seguido de *SRD5A2* y *SRD5A1*. No encontramos mutaciones en el gen *NR3C1*.

La mutación de tipo *missense* **c.2323C>T/p.(Arg775Cys)**, localizada en el exón 6 del gen *AR*, se identificó en un paciente joven diagnosticado con CaP de bajo grado. Este cambio de secuencia reemplaza la arginina con cisteína en el codón 775 de la proteína AR. El residuo de arginina está muy conservado y existe una gran diferencia fisicoquímica entre la arginina y la cisteína. Por otro lado, la mutación *nonsense* **c.2257C>T/p.(Arg753Ter)** identificada en un paciente adulto con CaP metastásico *de novo*, crea una señal de parada de traducción prematura. Estas variantes se han descrito en individuos y familias afectados por el síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (AIS) (Ledig et al., 2005; Melo et al., 2003), un trastorno que en su forma completa se caracteriza por un fenotipo femenino en un individuo con un cariotipo XY, en el que los testículos producen concentraciones normales de andrógenos (Hughes et al., 2012).

Ambas variantes se localizan en el dominio LBD del gen *AR*, el segundo dominio más conservado que consta de 11 hélices. La hélice carboxi-terminal, funciona como un interruptor intramolecular que, junto con la interacción con un agonista, da como resultado un surco hidrofóbico que sirve como sitio de unión para los coactivadores y para el dominio amino-terminal de el AR (Helsen et al., 2012). Mutaciones germinales en este dominio se han asociado con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (Y. Wang et al., 2017).

Llama la atención la presencia de estas mutaciones en células tumorales que dependen del receptor de andrógenos para su crecimiento y su presencia pone de manifiesto la existencia de clonas tumorales independientes del receptor de andrógenos.

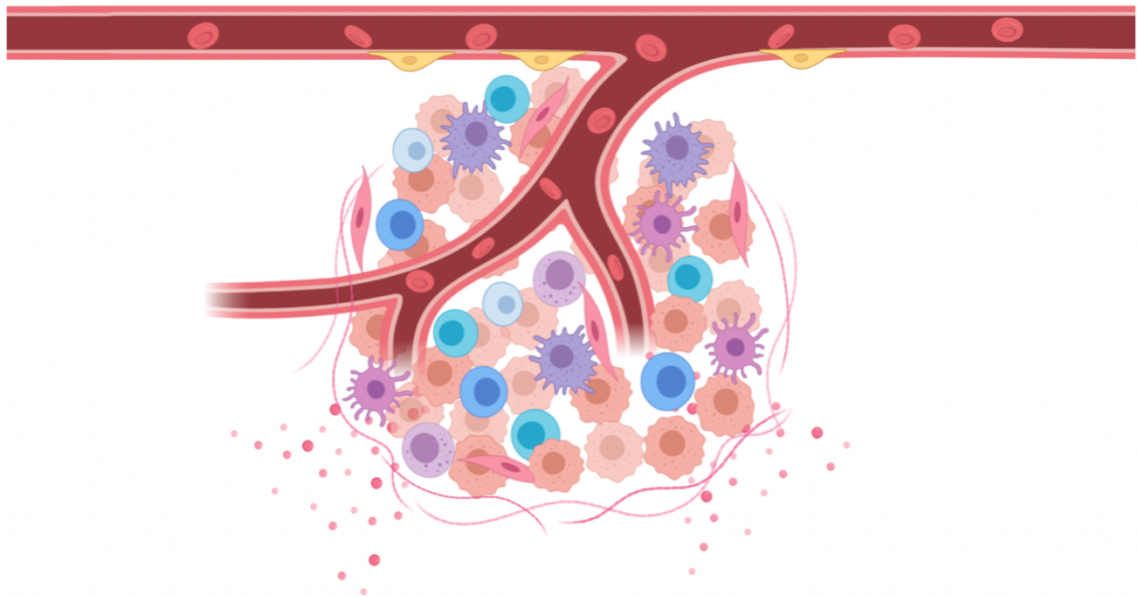
En el gen *AR* también encontramos una mutación *missense*, **c.404C>T/p.(Pro135Leu)**, catalogada como de significado clínico desconocido. Este paciente pertenecía al grupo de jóvenes y presentaba un CaP de bajo riesgo. Son necesarios más estudios para determinar la posible patogenicidad de esta mutación.

En el gen *AR* encontramos una delección de tipo *in-frame* **c.1368\_1379del/p.(Gly470\_Gly473del)**. Aunque está catalogada como de significado clínico desconocido en la plataforma Varsome, la mutación se encuentra en el exón 1 en la posición 456-470 del gen (921) por lo que, al estar ubicado a la mitad del gen podría estar afectando a la función de la proteína. Además, esta mutación presenta una frecuencia poblacional del 0,000023%. Por lo que esta mutación podría ser considerada como patogénica. Es necesario determinar si esta alteración produce un aumento o disminución de la actividad del receptor para definir su posible patogenicidad.

La información genómica generada a partir del tumor de un paciente se puede utilizar para una mejor estratificación y una terapia dirigida precisa para garantizar efectos secundarios mínimos y una respuesta de tratamiento (Yuan et al., 2018). A medida que se obtiene más información sobre las diversas vías implicadas en el CaP a través de NGS, se identifican más dianas farmacológicas potenciales. Nuestro trabajo confirma la implicación de genes de la vía de AR en la carcinogénesis tumoral. Por ello, sería necesario realizar estudios funcionales que confirmen nuestros resultados y utilizar un número de muestra mayor, ya que estas alteraciones podrían utilizarse como biomarcadores y posibles dianas terapéuticas.



# Conclusiones







1. La biopsia líquida en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a castración puede realizarse tanto en sangre periférica total como en plaquetas circulantes, siendo más sensible la determinación en plaquetas.
2. El aislamiento de plaquetas educadas por el tumor (TEPs) a partir de biopsia líquida, proporciona una fuente rentable, rápida y no invasiva para el diagnóstico del CaP metastásico *de novo*. Por esta razón, el RNA de los TEPs, surge como un nuevo biomarcador a partir de biopsia líquida, lo que lo hace idóneo como fuente para la obtención de mRNA de las AR-V.
3. El método de simple west en biopsia líquida de pacientes con CaP metastásico resistente a castración, aporta una sensibilidad adecuada para monitorizar la presencia de proteínas tumorales.
4. La detección de niveles altos de expresión del gen *ITGA2B* en plaquetas circulantes están relacionados con una peor supervivencia global, por lo que el estudio de los niveles de expresión de *ITGA2B* podría considerarse como un marcador pronóstico.
5. Los niveles de expresión de las AR-V están relacionadas con una menor supervivencia global y con una mayor tasa de mortalidad en los pacientes.
6. Altos niveles de circAR están asociados con una mayor mortalidad en pacientes con CaP metastásico resistente a castración, por lo que podrían ser utilizados como nuevos biomarcadores en el CaP.
7. El estudio de alteraciones genómicas de tumores de CaP pone de manifiesto la existencia de regiones diferenciales en el cáncer de próstata en jóvenes respecto a los tumores de adultos.

8. El estudio, mediante NGS, de genes relacionados con el receptor de andrógenos en tumores de próstata, revela la existencia de poblaciones celulares tumorales con mutaciones somáticas que inhiben la función del receptor, poniendo de manifiesto la posibilidad de crecimiento tumoral independiente del receptor.



# Anexos

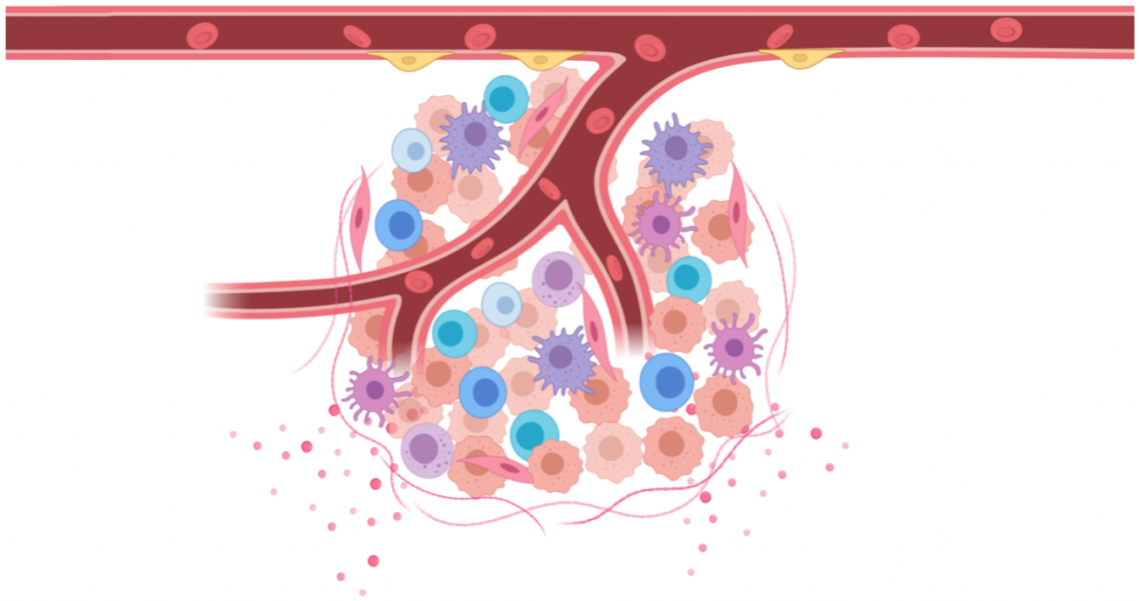


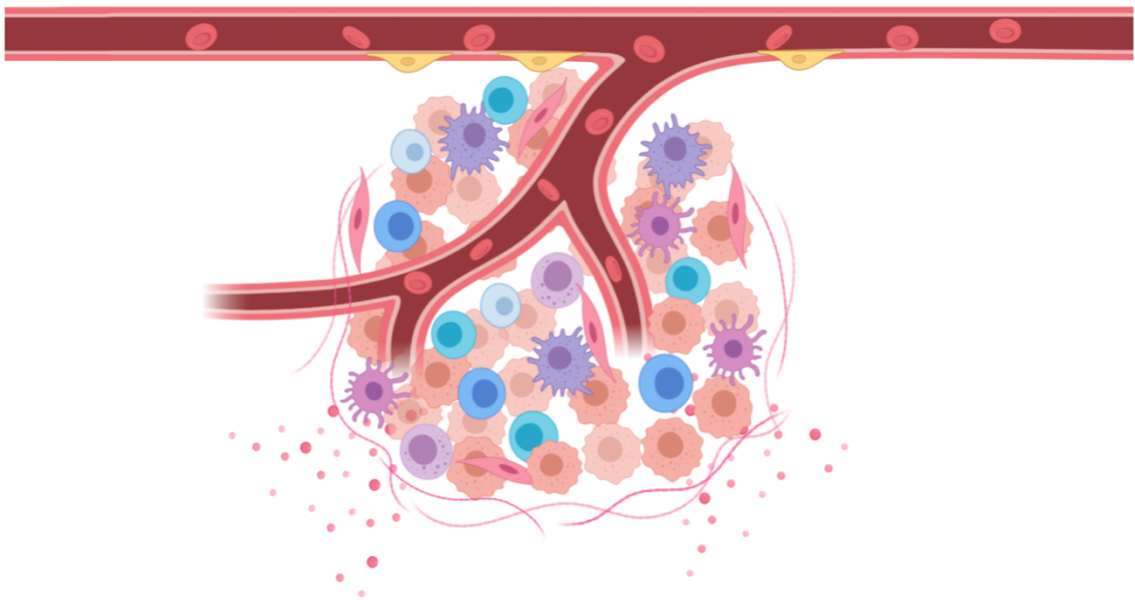


Tabla A-1. Distribución de las variantes neutrales en los genes incluidos en el panel por NGS.

	GEN	Cromosoma	Posición	Ref	Alt	db SNP	Variante	Clasificación	Nº Pacientes
chr2:31749714	SRD5A2	chr2	31749714	C	T	rs1042578	c.*1552G>A	3' UTR	4
chr2:31750210	SRD5A2	chr2	31750210	C	G	rs28383085	c.*1056G>C	3' UTR	1
chr2:31750417	SRD5A2	chr2	31750417	T	C	rs9332975	c.*849A>G	3' UTR	4
chr2:31751175	SRD5A2	chr2	31751175	G	A	rs192604242	c.*91C>T	3' UTR	4
chr2:31751178	SRD5A2	chr2	31751178	A	T	rs886055954	c.*88_*91delinsACC TATATATATATATAT ATATAT	3' UTR	4
chr2:31792526	SRD5A2	chr2	31792526	G	A		c.e1-13164C>T	3' UTR	1
chr5:142657621	NR3C1	chr5	142657621	T	C	rs6198	c.*3833A>G	3' UTR	1
chr5:142658156	NR3C1	chr5	142658156	C	A	rs6191	c.*3298G>T	3' UTR	6
chr5:142783013	NR3C1	chr5	142783013	A	G	rs10482611	c.-251T>C	5' UTR	8
chr5:142783087	NR3C1	chr5	142783087	A	C	rs10482609	c.-325T>G	5' UTR	1
chr5:6668842	SRD5A1	chr5	6668842	C	T	rs3297	c.*461C>T	3' UTR	8
chr5:6669000	SRD5A1	chr5	6669000	A	G	rs13974	c.*619A>G	3' UTR	2
chr5:6669536	SRD5A1	chr5	6669536	T	C	rs8192257	c.*1155T>C	3' UTR	2
chrX:66914801	AR	chrX	66914801	T	C	rs5918762	c.*237T>C	3' UTR	6
chrX:66915607	AR	chrX	66915607	A	T	rs7065530	c.*1043A>T	3' UTR	5
chrX:66945740	AR	chrX	66945740	T	C	rs5919413	c.*2057T>C	3' UTR	8
chrX:66946851	AR	chrX	66946851	T	C	rs1931537	c.*3168T>C	3' UTR	8
chrX:66949722	AR	chrX	66949722	C	T	rs7440	c.*6039C>T	3' UTR	8
chrX:66950105	AR	chrX	66950105	C	T	rs2362520	c.*6422C>T	3' UTR	8
chr2:31756669	SRD5A2	chr2	31756669	C	T	rs1240502347	n.612-127G>A	Intron Variant	1
chr2:31805619	SRD5A2	chr2	31805619	T	C	rs619857	n.447+71A>G	Intron Variant	8
chr2:31805675	SRD5A2	chr2	31805675	A	G	rs522638	c.281+15T>C	Intron Variant	8
chr2:31806031	SRD5A2	chr2	31806031	C	G	rs632148	c.-62G>C	Intron Variant	8
chr5:142672920	NR3C1	chr5	142672920	T	C		c.e7-2105A>G	Intron Variant	1
chr5:142672921	NR3C1	chr5	142672921	T	A		c.e7-2104A>T	Intron Variant	1
chr5:142673397	NR3C1	chr5	142673397	A	G	rs17209258	c.2026+1628T>C	Intron Variant	4
chr5:142673942	NR3C1	chr5	142673942	C	G	rs33944801	c.2026+1083G>C	Intron Variant	4
chr5:142673995	NR3C1	chr5	142673995	A	G		c.e7-1030T>C	Intron Variant	1
chr5:142674690	NR3C1	chr5	142674690	G	A	rs258813	c.2026+335C>T	Intron Variant	2
chr5:142680344	NR3C1	chr5	142680344	C	A	rs6188	c.1472-16G>T	Intron Variant	2
chr5:142680569	NR3C1	chr5	142680569	G	C		c.e5+241C>G	Intron Variant	1
chr5:142689824	NR3C1	chr5	142689824	C	G	rs61753484	c.1355-46G>C	Intron Variant	2
chr5:142693398	NR3C1	chr5	142693398	T	C	rs852979	c.1354+166A>G	Intron Variant	1
chr5:142693846	NR3C1	chr5	142693846	A	G	rs4986593	c.1185-113T>C	Intron Variant	4
chr5:142780695	NR3C1	chr5	142780695	C	A	rs4582314	c.-13-278G>T	Intron Variant	2
chr5:142780697	NR3C1	chr5	142780697	C	T	rs4634384	c.-13-280G>A	Intron Variant	2
chr5:142780855	NR3C1	chr5	142780855	G	T		c.e2+438C>A	Intron Variant	1
chr5:142782571	NR3C1	chr5	142782571	T	G	rs4406157	c.-14+205A>C	Intron Variant	1
chr5:142783268	NR3C1	chr5	142783268	A	G	rs10482606	c.-13-2851T>C	Intron Variant	3
chr5:142792484	NR3C1	chr5	142792484	G	T	rs9324924	c.-13-12067C>A	Intron Variant	1
chr5:142799665	NR3C1	chr5	142799665	A	C	rs188966000	c.-14+14432T>G	Intron Variant	1
chr5:142808143	NR3C1	chr5	142808143	A	T		c.e2-5141T>A	Intron Variant	1
chr5:6645016	SRD5A1	chr5	6645016	A	G	rs248805	p.Thr139Ala	Intron Variant	8
chr5:6645481	SRD5A1	chr5	6645481	G	A	rs888473510	c.294-6474G>A	Intron Variant	1
chr5:6645490	SRD5A1	chr5	6645490	G	T		c.e2-6465G>T	Intron Variant	1
chr5:6652252	SRD5A1	chr5	6652252	G	A	rs3733773	c.460+131G>A	Intron Variant	7
chr5:6653453	SRD5A1	chr5	6653453	T	A		c.e2+1332T>A	Intron Variant	1
chr5:6653474	SRD5A1	chr5	6653474	A	G	rs8192190	c.460+1353A>G	Intron Variant	1
chr5:6656003	SRD5A1	chr5	6656003	G	A	rs540212	c.461-188G>A	Intron Variant	5
chr5:6662566	SRD5A1	chr5	6662566	A	G	rs148352265	c.563-363A>G	Intron Variant	1
chrX:66796087	AR	chrX	66796087	A	G	rs2767564	c.1616+29483A>G	Intron Variant	1
chrX:66863378	AR	chrX	66863378	A	C		c.e2+129A>C	Intron Variant	1
chrX:66863453	AR	chrX	66863453	T	G	rs2361635	c.1768+204T>G	Intron Variant	2
chrX:66915656	AR	chrX	66915656	C	G	rs112320270	c.*1092C>G	Intron Variant	4
chrX:66915678	AR	chrX	66915678	T	C		c.e3+9710T>C	Intron Variant	1
chrX:66915680	AR	chrX	66915680	C	T		c.e3+9712C>T	Intron Variant	1
chrX:66931037	AR	chrX	66931037	A	T	rs61530657	c.1886-207A>T	Intron Variant	2
chrX:66937707	AR	chrX	66937707	A	G	rs5918764	c.2318+243A>T	Intron Variant	3
chrX:66937749	AR	chrX	66937749	A	G	rs56348100	c.2318+285A>G	Intron Variant	1
chrX:66939598	AR	chrX	66939598	G	A		c.e6-2077G>A	Intron Variant	1
chrX:66941597	AR	chrX	66941597	T	G	rs1337076	c.2319-78T>G	Intron Variant	8
chrX:66943156	AR	chrX	66943156	G	C	rs4993619	c.2607+330G>C	Intron Variant	3
chr5:142661490	NR3C1	chr5	142661490	A	G	rs6196	c.2298T>C/p.Asn767	Synonymous	1
chr5:6651970	SRD5A1	chr5	6651970	A	G	rs3822430	p.Pro103Pro	Synonymous	7
chr5:6652009	SRD5A1	chr5	6652009	G	A	rs8192186	p.Ala116Ala	Synonymous	7
chr5:6656210	SRD5A1	chr5	6656210	G	A	rs3736316	p.Thr160Thr	Synonymous	7
chrX:66765627	AR	chrX	66765627	G	A	rs6152	c.639G>A/p.Glu213G	Synonymous	4
chrX:66766371	AR	chrX	66766371	C	T	rs768280979	c.1383C>T	Synonymous	1



# Bibliografía







- Agoulnik, I. U., & Weigel, N. L. (2006). Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(2), 362–372. <https://doi.org/10.1002/jcb.20811>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2014). Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. In *Lab on a Chip* (Vol. 14, Issue 1, pp. 57–62). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3lc50644d>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., Chen, Y., Mohammad, T. A., Chen, Y., Fedor, H. L., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., ... Luo, J. (2014). AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1028–1038. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1315815>
- Arap, W., Pasqualini, R., & Costello, J. F. (2020). Prostate Cancer Progression and the Epigenome. *New England Journal of Medicine*, 383(23), 2287–2290. <https://doi.org/10.1056/nejmcibr2030475>
- Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., Evantal, N., Memczak, S., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2014). CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 56(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019>
- Attard, G., Reid, A. H. M., Olmos, D., & De Bono, J. S. (2009). Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. In *Cancer Research* (Vol. 69, Issue 12, pp. 4937–4940). American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4531>
- Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., & Mohler, J. (2012). The 5 alpha-reductase isozyme family: A review of basic biology and their role in human diseases. In *Advances in Urology*. <https://doi.org/10.1155/2012/530121>
- Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., Van Allen, E., Kryukov, G. V., Sboner, A., Theurillat, J. P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., ... Garraway, L. A. (2013). Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*, 153(3), 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>
- Bach, D. H., Lee, S. K., & Sood, A. K. (2019). Circular RNAs in Cancer. In *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Vol. 16, pp. 118–129). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.005>
- Bahn, J. H., Zhang, Q., Li, F., Chan, T.-M., Lin, X., Kim, Y., Wong, D. T. W., & Xiao, X. (2015). The Landscape of MicroRNA, Piwi-Interacting RNA, and Circular RNA in Human Saliva. *Clinical Chemistry*, 61(1), 221–230. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230433>
- Balk, S. P., Ko, Y. J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 383–391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.083>
- Barresi, V., Signorelli, S. S., Musso, N., & Fiore, V. (2014). ICAM-1 and SRD5A1 gene

- polymorphisms in symptomatic peripheral artery disease Collaboration with a Private Clinical View project Air Pollution and TVE View project. *Vascular Medicine*, 19(3), 175–181. <https://doi.org/10.1177/1358863X14532705>
- Barrett, S. P., & Salzman, J. (2016). Circular RNAs: Analysis, expression and potential functions. *Development (Cambridge)*, 143(11), 1838–1847. <https://doi.org/10.1242/dev.128074>
- Bartsch, G., Rittmaster, R. S., & Klocker, H. (2000). Dihydrotestosterone and the Concept of 5 $\alpha$ -Reductase Inhibition in Human Benign Prostatic Hyperplasia. *European Urology*, 37(4), 367–380. <https://doi.org/10.1159/000020181>
- Begley, L. A., Kasina, S., MacDonald, J., & Macoska, J. A. (2008). The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 43(2), 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.05.012>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bitting, R. L., Schaeffer, D., Somarelli, J. A., Garcia-Blanco, M. A., & Armstrong, A. J. (2014). The role of epithelial plasticity in prostate cancer dissemination and treatment resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2–3), 441–468. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9483-z>
- Body, J. J., Casimiro, S., & Costa, L. (2015). Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. In *Nature reviews. Urology* (Vol. 12, Issue 6, pp. 340–356). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.90>
- Borsig, L. (2008). The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 8(8), 1247–1255. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.8.1247>
- Bostwick, D. G., & Cheng, L. (2012). Precursors of prostate cancer. *Histopathology*, 60(1), 4–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04007.x>
- Boudadi, K., & Antonarakis, E. S. (2016). Resistance to Novel Antiandrogen Therapies in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 10s1, CMO.Ss34534. <https://doi.org/10.4137/CMO.Ss34534>
- Boyd, L. K., Mao, X., & Lu, Y. J. (2012). The complexity of prostate cancer: Genomic alterations and heterogeneity. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 652–664). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.185>
- Buergy, D., Wenz, F., Groden, C., & Brockmann, M. A. (2012). Tumor-platelet interaction in solid tumors. *International Journal of Cancer*, 130(12), 2747–2760. <https://doi.org/10.1002/ijc.27441>
- Cabarkapa, S., Perera, M., McGrath, S., & Lawrentschuk, N. (2016). Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: A guide to the guidelines. In *Prostate International* (Vol. 4, Issue 4, pp. 125–129). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnil.2016.09.002>
- Caffo, O., Maines, F., Veccia, A., Kinspergher, S., & Galligioni, E. (2016). Splice variants of androgen receptor and prostate cancer. *Oncology Reviews*, 10(1), 297–297.

- <https://doi.org/10.4081/oncol.2016.297>
- Cáncer de próstata: Estadios y Grados | *Cancer.Net*. (n.d.). Retrieved April 28, 2020, from <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-próstata/estadios-y-grados>
- Cao, B., Qi, Y., Zhang, G., Xu, D., Zhan, Y., Alvarez, X., Guo, Z., Fu, X., Plymate, S. R., Sartor, O., Zhang, H., & Dong, Y. (2014). Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget*, 5(6), 1646–1656. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1802>
- Cao, S., Ma, T., Ungerleider, N., Roberts, C., Kobelski, M., Jin, L., Concha, M., Wang, X., Baddoo, M., Nguyen, H. M., Corey, E., Fazli, L., Ledet, E., Zhang, R., Silberstein, J. L., Zhang, W., Zhang, K., Sartor, O., Dong, X., ... Dong, Y. (2019a). Circular RNAs add diversity to androgen receptor isoform repertoire in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 38(45), 7060–7072. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0947-7>
- Cao, S., Ma, T., Ungerleider, N., Roberts, C., Kobelski, M., Jin, L., Concha, M., Wang, X., Baddoo, M., Nguyen, H. M., Corey, E., Fazli, L., Ledet, E., Zhang, R., Silberstein, J. L., Zhang, W., Zhang, K., Sartor, O., Dong, X., ... Dong, Y. (2019b). Circular RNAs add diversity to androgen receptor isoform repertoire in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 38(45), 7060–7072. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0947-7>
- Carlberg, C., & Molnár, F. (2016). Mechanisms of gene regulation, second edition. In *Mechanisms of Gene Regulation, Second Edition*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7741-4>
- Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., Richie, J. P., DeKernion, J. B., Walsh, P. C., Scardino, P. T., Lange, P. H., Subong, E. N. P., Parson, R. E., Gasior, G. H., Loveland, K. G., & Southwick, P. C. (1998). Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 279(19), 1542–1547. <https://doi.org/10.1001/jama.279.19.1542>
- Chang, B. L., Liu, W., Sun, J., Dimitrov, L., Li, T., Turner, A. R., Zheng, S. L., Isaacs, W. B., & Xu, J. (2007). Integration of Somatic deletion analysis of prostate cancers and germline linkage analysis of prostate cancer families reveals two small consensus regions for prostate cancer genes at 8p. *Cancer Research*, 67(9), 4098–4103. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4570>
- Chang, S. W., Su, C. H., Chen, H. H., Huang, C. W., Tsao, L. P., Tsao, Y. P., & Chen, S. L. (2012). DDB2 is a novel AR interacting protein and mediates AR ubiquitination/ degradation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(11), 1952–1961. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.023>
- Chen, L.-L., & Yang, L. (2015). Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biology*, 12(4), 381–388. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020271>
- Chen, N., & Zhou, Q. (2016). The evolving gleason grading system. In *Chinese Journal of Cancer Research* (Vol. 28, Issue 1, pp. 58–64). AME Publishing Company.

- <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04>
- Chen, X., Bernemann, C., Tolkach, Y., Heller, M., Nientiedt, C., Falkenstein, M., Herpel, E., Jenzer, M., Grüllich, C., Jäger, D., Sülthmann, H., Duensing, A., Perner, S., Cronauer, M. V., Stephan, C., Debus, J., Schrader, A. J., Kristiansen, G., Hohenfellner, M., & Duensing, S. (2018). Overexpression of nuclear AR-V7 protein in primary prostate cancer is an independent negative prognostic marker in men with high-risk disease receiving adjuvant therapy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 36(4), 161.e19-161.e30. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.11.001>
- Chen, Y., & Lan, T. (2020). Molecular Origin, Expression Regulation, and Biological Function of Androgen Receptor Splicing Variant 7 in Prostate Cancer. *Urologia Internationalis*, 1–17. <https://doi.org/10.1159/000510124>
- Chughtai, B., Forde, J. C., Thomas, D. D. M., Laor, L., Hossack, T., Woo, H. H., Te, A. E., & Kaplan, S. A. (2016). Benign prostatic hyperplasia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–15. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.31>
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., & Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Receptor Signaling*, 6(1), nrs.06008. <https://doi.org/10.1621/nrs.06008>
- Cohen, S. A., Trikha, M., & Mascelli, M. A. (2000). Potential future clinical applications for the GPIIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications. In *Pathology and Oncology Research* (Vol. 6, Issue 3, pp. 163–174). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1007/BF03032368>
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(1), 1–56. <https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
- Cooperberg, M. R., Broering, J. M., & Carroll, P. R. (2009). Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(12), 878–887. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp122>
- Coutinho, I., Day, T. K., Tilley, W. D., & Selth, L. A. (2016). Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: A lesson in persistence. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 23, Issue 12, pp. T179–T197). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0422>
- Crona, D. J., & Whang, Y. E. (2017). Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms involved in prostate cancer therapy resistance. In *Cancers* (Vol. 9, Issue 6, p. 67). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers9060067>
- D'Amico, A. V., Whittington, R., Bruce Malkowicz, S., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G. A., Tomaszewski, J. E., Renshaw, A. A., Kaplan, I., Beard, C. J., & Wein, A. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Journal of the American Medical Association*, 280(11), 969–974. <https://doi.org/10.1001/jama.280.11.969>
- Dalton, J. T., & Gao, W. (2010). Androgen Receptor. In *Nuclear Receptors* (pp. 143–182).

- Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3303-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3303-1_6)
- Datta, K., Muders, M., Zhang, H., & Tindall, D. J. (2010). Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. In *Future Oncology* (Vol. 6, Issue 5, pp. 823–836). Future Medicine Ltd London, UK . <https://doi.org/10.2217/fon.10.33>
- Datta, K., & Tindall, D. J. (2013). Endocrine mechanisms, androgen receptor and carcinogenesis, and hormone escape. In *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective* (pp. 35–41). Springer-Verlag London Ltd. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2864-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2864-9_3)
- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 37(1), 3–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057074>
- De Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., MacHiels, J. P., Kocak, I., Gravis, G., Bodrogi, I., MacKenzie, M. J., Shen, L., Roessner, M., Gupta, S., & Sartor, A. O. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *The Lancet*, 376(9747), 1147–1154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X)
- De Laere, B., van Dam, P. J., Whittington, T., Mayrhofer, M., Diaz, E. H., Van den Eynden, G., Vandebroek, J., Del-Favero, J., Van Laere, S., Dirix, L., Grönberg, H., & Lindberg, J. (2017). Comprehensive Profiling of the Androgen Receptor in Liquid Biopsies from Castration-resistant Prostate Cancer Reveals Novel Intra-AR Structural Variation and Splice Variant Expression Patterns. *European Urology*, 72(2), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.01.011>
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 7, Issue 4, pp. 256–269). <https://doi.org/10.1038/nrc2090>
- Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011a). Alternatively spliced androgen receptor variants. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 18, Issue 5, pp. R183–R196). <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0141>
- Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011b). Alternatively spliced androgen receptor variants. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 18, Issue 5, p. R183). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0141>
- Dhurat, R., & Sukesh, M. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7(4), 189. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>
- Duma, D., Jewell, C. M., & Cidlowski, J. A. (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5 SPEC. ISS.), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.009>
- Dumur, C. I., Dechsukhum, C., Ware, J. L., Cofield, S. S., Best, A. M., Wilkinson, D. S., Garrett, C. T., & Ferreira-Gonzalez, A. (2003). Genome-wide detection of LOH in prostate cancer using human SNP microarray technology. *Genomics*, 81(3), 260–269.

- [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00020-X)
- Egevad, L., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Samaratunga, H. (2016). International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer – An ISUP consensus on contemporary grading. In *APMIS* (Vol. 124, Issue 6, pp. 433–435). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/apm.12533>
- Ellis, L., Ku, S.-Y., Lasorsa, E., & Pili, R. (2014). *Epigenetics in Castration Resistant Prostate Cancer* (pp. 277–295). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1176-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1176-9_20)
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Fizazi, K., Scher, H. I., Miller, K., Basch, E., Sternberg, C. N., Cella, D., Forer, D., Hirmand, M., & de Bono, J. S. (2014). Effect of enzalutamide on time to first skeletal-related event, pain, and quality of life in men with castration-resistant prostate cancer: Results from the randomised, phase 3 AFFIRM trial. *The Lancet Oncology*, 15(10), 1147–1156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70303-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70303-1)
- Galletti, G., Worroll, D., Nanus, D. M., & Giannakakou, P. (2017). Using circulating tumor cells to advance precision medicine in prostate cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3(9), 190. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.45>
- García-Figueroa, I., Candia, M. N., Pereda-Meira, C. M., & Laborí-Carda, C. M. (2015). Papel de los estrógenos y sus receptores en las enfermedades benignas y malignas prostáticas: Parte 1. In *Revista Mexicana de Urología* (Vol. 75, Issue 5, pp. 283–291). Elsevier Doyma Mexico. <https://doi.org/10.1016/j.uromx.2015.06.007>
- García, J. L., Lozano, R., Misiewicz-Krzeminska, I., Fernández-Mateos, J., Krzeminski, P., Alfonso, S., Marcos, R. A., García, R., Gómez-Veiga, F., Virseda, Herrero, M., Olmos, D., & Cruz-Hernández, J. J. (2017). A novel capillary nano-immunoassay for assessing androgen receptor splice variant 7 in plasma. Correlation with CD133 antigen expression in circulating tumor cells. A pilot study in prostate cancer patients. *Clinical and Translational Oncology*, 19(11), 1350–1357. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1675-5>
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., Lee, C., Wagner, S. N., Li, C., Golub, T. R., Rimm, D. L., Meyerson, M. L., Fisher, D. E., & Sellers, W. R. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047), 117–122. <https://doi.org/10.1038/nature03664>
- Garrido, A., Muñoz, Y., Sierralta, W., & Valladares, L. (2012). *Metabolism of Dehydroepiandrosterone Sulfate and Estrone-Sulfate by Human Platelets*. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932323>
- Ghanbarpanah, E., Ma, K., & Beheshti, F. H. (2018). Structure and function of FUS gene in prostate cancer. *Science Citation Index Expanded and in Journal Citation Reports/Science Edition Bratisl Med J*, 119(10). [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2018\\_118](https://doi.org/10.4149/BLL_2018_118)



- Global Cancer Observatory*. (n.d.). Retrieved May 8, 2020, from <https://gco.iarc.fr/>
- Gobinet, J., Poujol, N., & Sultan, C. (2002). Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1–2), 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00364-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00364-7)
- Goodman, S. L., & Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 33, Issue 7, pp. 405–412). Trends Pharmacol Sci. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.002>
- Guan, M., Zhou, X., Soultzis, N., Spandidos, D. A., & Popescu, N. C. (2006). Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: Potential clinical applications. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1412–1419. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1906>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harik, L. R., & O'Toole, K. M. (2012). Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. In *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* (Vol. 136, Issue 7, pp. 721–734). <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0584-RA>
- Harper, K. L., Sosa, M. S., Entenberg, D., Hosseini, H., Cheung, J. F., Nobre, R., Avivar-Valderas, A., Nagi, C., Girnius, N., Davis, R. J., Farias, E. F., Condeelis, J., Klein, C. A., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2016). Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature*, 540(7634), 588–592. <https://doi.org/10.1038/nature20609>
- Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. In *Endocrine Reviews* (Vol. 28, Issue 7, pp. 778–808). <https://doi.org/10.1210/er.2007-0019>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. In *Endocrine Reviews* (Vol. 25, Issue 2, pp. 276–308). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>
- Helsen, C., Dubois, V., Verfaillie, A., Young, J., Trekels, M., Vancaenenbroeck, R., De Maeyer, M., & Claessens, F. (2012). Evidence for DNA-Binding Domain-Ligand-Binding Domain Communications in the Androgen Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 32(15), 3033–3043. <https://doi.org/10.1128/mcb.00151-12>
- Hench, I. B., Hench, J., & Tolnay, M. (2018). Liquid biopsy in clinical management of breast, lung, and colorectal cancer. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 5, Issue JAN, p. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00009>
- Hodara, E., Morrison, G., Cunha, A., Zainfeld, D., Xu, T., Xu, Y., Dempsey, P. W., Pagano, P. C., Bischoff, F., Khurana, A., Koo, S., Ting, M., Cotter, P. D., Moore, M. W., Gunn, S., Usher, J., Rabizadeh, S., Danenberg, P., Danenberg, K., ... Goldkorn, A. (2019). Multiparametric liquid biopsy analysis in metastatic prostate cancer. *JCI Insight*, 4(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125529>
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: An evolving paradigm. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 13, Issue 10, pp. 714–726). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>



- Hörnberg, E., Ylitalo, E. B., Crnalic, S., Antti, H., Stattin, P., Widmark, A., Bergh, A., & Wikström, P. (2011). Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival. *PLoS ONE*, 6(4), e19059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019059>
- Hsing, A. W., Sakoda, L. C., Chen, J., Chokkalingam, A. P., Sesterhenn, I., Gao, Y. T., Xu, J., & Zheng, S. L. (2007). MSR1 variants and the risks of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: A population-based study in China. *Carcinogenesis*, 28(12), 2530–2536. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm196>
- Hu, R., Dunn, T. A., Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R. W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A. W., Vessella, R. L., Isaacs, W. B., Bova, G. S., & Luo, J. (2009a). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 69(1), 16–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2764>
- Hu, R., Dunn, T. A., Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R. W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A. W., Vessella, R. L., Isaacs, W. B., Bova, G. S., & Luo, J. (2009b). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 69(1), 16–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2764>
- Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E. A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W. B., Nelson, P. S., Bluemn, E., Plymate, S. R., & Luo, J. (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 72(14), 3457–3462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3892>
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). *Studies on Prostatic Cancer I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate\**.
- Hughes, I. A., Davies, J. D., Bunch, T. I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., & Macdougall, J. (2012). Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet*, 380(9851), 1419–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60071-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60071-3)
- Ilic, D., Neuberger, M. M., Djulbegovic, M., & Dahm, P. (2013). Screening for prostate cancer. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2013, Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004720.pub3>
- Itoh T, Iwashita S, Cohen MB, Meyerholz DK, Linn S. (2007). Ddb2 is a haploinsufficient tumor suppressor and controls spontaneous germ cell apoptosis. *Human Molecular Genetics*. 16, 1578-86.
- Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J., & Swanton, C. (2015). Translational implications of tumor heterogeneity. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 21, Issue 6, pp. 1258–1266). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1429>
- Jaworski, T. (2006). Degradation and beyond: Control of androgen receptor activity by the

- proteasome system. In *Cellular and Molecular Biology Letters* (Vol. 11, Issue 1, pp. 109–131). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0011-9>
- Jentzmik, F., Azoitei, A., Zengerling, F., Damjanoski, I., & Cronauer, M. V. (2016). Androgen receptor aberrations in the era of abiraterone and enzalutamide. In *World Journal of Urology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 297–303). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00345-015-1624-2>
- Joose, S. A., & Pantel, K. (2015). Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. In *Cancer Cell* (Vol. 28, Issue 5, pp. 552–554). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.007>
- Khetawat, G., Faraday, N., Nealen, M. L., Vijayan, K. V., Bolton, E., Noga, S. J., & Bray, P. F. (2000). The androgen receptor (AR) is a critical effector of prostate cancer development and progression. The dependence of this tumor type on AR activity is exploited in treatment of disseminated prostate cancers, wherein ablation of AR function (achieved either th. *Blood*, 95(7), 2289–2296. <https://doi.org/10.1182/blood.v95.7.2289>
- Kleppe, M., & Levine, R. L. (2014). Tumor Heterogeneity Confounds and Illuminates: Assessing the implications. In *Nature Medicine* (Vol. 20, Issue 4, pp. 342–344). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.3522>
- Krieger, J. N., Lee, S. W. H., Jeon, J., Cheah, P. Y., Liong, M. L., & Riley, D. E. (2008). Epidemiology of prostatitis. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 31, Issue SUPPL. 1, pp. 85–90). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.08.028>
- Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V. W., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2019). The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 20, Issue 11, pp. 675–691). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>
- Kubina H., Tsuda M., Nakashima M., Miura S., Miyake N., Kondoh T., et al. (2008) Lack of C20orf113 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J. Med. Genet.* 45, 479-480. [110.1136/jmgen.2008.058503](https://doi.org/10.1136/jmgen.2008.058503)
- Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y., & Bapat, S. A. (2009). Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. *Stem Cells*, 27(9), 2059–2068. <https://doi.org/10.1002/stem.154>
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., LeClerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., De Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., ... Brown, R. H. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323(5918), 1205–1208. <https://doi.org/10.1126/science.1166066>
- Kyprianou, N., & Isaacs, J. T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration\*. *Endocrinology*, 122(2), 552–562. <https://doi.org/10.1210/endo-122-2-552>

- Labelle, M., Begum, S., & Hynes, R. O. (2011). Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*, 20(5), 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>
- Lam, H. Y. K., Clark, M. J., Chen, R., Chen, R., Natsoulis, G., O'Huallachain, M., Dewey, F. E., Habegger, L., Ashley, E. A., Gerstein, M. B., Butte, A. J., Ji, H. P., & Snyder, M. (2012). Performance comparison of whole-genome sequencing platforms. *Nature Biotechnology*, 30(1), 78–82. <https://doi.org/10.1038/nbt.2065>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 178–196). <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lang, S., Frame, F., & Collins, A. (2009). Prostate cancer stem cells. *The Journal of Pathology*, 217(2), 299–306. <https://doi.org/10.1002/path.2478>
- Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer? In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Issue 4, pp. 232–233). <https://doi.org/10.1038/nrc2827>
- Ledig, S., Jakubiczka, S., Neulen, J., Aulepp, U., Burck-Lehmann, U., Mohnike, K., Thiele, H., Zierler, H., Brewer, C., & Wieacker, P. (2005). Novel and recurrent mutations in patients with androgen insensitivity syndromes. *Hormone Research*, 63(6), 263–269. <https://doi.org/10.1159/000086018>
- Leukocyte Preparation Protocol: R&D Systems*. (n.d.). Retrieved May 9, 2020, from <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/leukocyte-preparation-protocol>
- Leung, J. K., & Sadar, M. D. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 2. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00002>
- Li, J., Sun, D., Pu, W., Wang, J., & Peng, Y. (2020). Circular RNAs in Cancer: Biogenesis, Function, and Clinical Significance. In *Trends in Cancer* (Vol. 6, Issue 4, pp. 319–336). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.012>
- Li, N. (2016). Platelets in cancer metastasis: To help the “villain” to do evil. *International Journal of Cancer*, 138(9), 2078–2087. <https://doi.org/10.1002/ijc.29847>
- Li, S., Ma, Y., Xie, C., Wu, Z., Kang, Z., Fang, Z., Su, B., & Guan, M. (2015). EphA6 promotes angiogenesis and prostate cancer metastasis and is associated with human prostate cancer progression. *Oncotarget*, 6(26), 22587–22597. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4088>
- Liao, R. S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., & Raj, G. V. (2013). Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 187–196). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07>
- Lin, C. Y., Jan, Y. J., Kuo, L. K., Wang, B. J., Huo, C., Jiang, S. S., Chen, S. C., Kuo, Y. Y., Chang, C. R., & Chuu, C. P. (2018). Elevation of androgen receptor promotes prostate cancer metastasis by induction of epithelial-mesenchymal transition and reduction of KAT5. *Cancer Science*, 109(11), 3564–3574. <https://doi.org/10.1111/cas.13776>

- Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B. gun, Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D. W., Fu, X. D., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2009). Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer. *Cell*, 139(6), 1069–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.030>
- Liu, G., Sprenger, C., Wu, P. J., Sun, S., Uo, T., Haugk, K., Epilepsia, K. S., & Plymate, S. (2015). MED1 mediates androgen receptor splice variant induced gene expression in the absence of ligand. *Oncotarget*, 6(1), 288–304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2672>
- Lo Re, O., Mazza, T., & Vinciguerra, M. (2018). Mono-ADP-Ribosylhydrolase MACROD2 Is Dispensable for Murine Responses to Metabolic and Genotoxic Insults. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00654>
- Lonergan, P., & Tindall, D. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*, 10. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.83937>
- Lu, C., & Luo, J. (2013). Decoding the androgen receptor splice variants. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 178–186). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.08>
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Molecular Cell*, 18(3), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.025>
- Lu, X., Wan, F., Zhang, H., Shi, G., & Ye, D. (2016). ITGA2B and ITGA8 are predictive of prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients. *Tumor Biology*, 37(1), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3792-5>
- Luo, J., Li, Y., Zheng, W., Xie, N., Shi, Y., Long, Z., Xie, L., Fazli, L., Zhang, D., Gleave, M., & Dong, X. (2019). Characterization of a Prostate- and Prostate Cancer-Specific Circular RNA Encoded by the Androgen Receptor Gene. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 18, 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.015>
- Mass N. M., Van De Putte T., Melotte C., Francis A., Schrandt-Stumpel C. T., Sanlaville D., et al. (2007). The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. *J Med. Genet.* 44, 562-569. [10.1136/jmg.2007.049510](https://doi.org/10.1136/jmg.2007.049510)
- Man, Y. gao, Zhao, C., & Chen, X. (2006). A subset of prostate basal cells lacks the expression of corresponding phenotypic markers. *Pathology Research and Practice*, 202(9), 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2006.05.005>
- Marín-Aguilera, M., Reig, Ò., Lozano, J. J., Jiménez, N., García-Recio, S., Erill, N., Gaba, L., Tagliapietra, A., Ortega, V., Carrera, G., Colomer, A., Gascón, P., & Mellado, B. (2015). Molecular profiling of peripheral blood is associated with circulating tumor cells content and poor survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 6(12), 10604–10616. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3550>
- Mattox, A. K., Bettgowda, C., Zhou, S., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2019). Applications of liquid biopsies for cancer. *Science Translational Medicine*, 11(507). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1984>
- McAllister, S. S., & Weinberg, R. A. (2014). The tumour-induced systemic environment as a

- critical regulator of cancer progression and metastasis. In *Nature Cell Biology* (Vol. 16, Issue 8, pp. 717–727). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncb3015>
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35–49. <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
- Melo, K. F. S., Mendonca, B. B., Billerbeck, A. E. C., Costa, E. M. F., Inácio, M., Silva, F. A. Q., Leal, A. M. O., Latronico, A. C., & Arnhold, I. J. P. (2003). Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: Five novel mutations in the androgen receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(7), 3241–3250. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021658>
- Menter, D. G., Tucker, S. C., Kopetz, S., Sood, A. K., Crissman, J. D., & Honn, K. V. (2014). Platelets and cancer: A casual or causal relationship: Revisited. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 33, Issue 1, pp. 231–269). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9498-0>
- Middleton, L. W., Shen, Z., Varma, S., Pollack, A. S., Gong, X., Zhu, S., Zhu, C., Foley, J. W., Vennam, S., Sweeney, R. T., Tu, K., Biscocho, J., Eminaga, O., Nolley, R., Tibshirani, R., Brooks, J. D., West, R. B., & Pollack, J. R. (2019). Genomic analysis of benign prostatic hyperplasia implicates cellular relandscape in disease pathogenesis. *JCI Insight*, 4(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129749>
- Misiewicz-Krzeminska, I., Corchete, L. A., Rojas, E. A., Martínez-López, J., García-Sanz, R., Oriol, A., Bladé, J., Lahuerta, J. J., Miguel, J. S., Mateos, M. V., & Gutiérrez, N. C. (2018). A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: Biological and clinical utility. *Haematologica*, 103(5), 880–889. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.181628>
- Mohler, J. L., Gregory, C. W., Harris, O., Iii, F., Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., & French, F. S. (2004). *The Androgen Axis in Recurrent Prostate Cancer*.
- Mohseni, M., Cidado, J., Croessmann, S., Cravero, K., Cimino-Mathews, A., Wong, H. Y., Scharpf, R., Zabransky, D. J., Abukhdeir, A. M., Garay, J. P., Wang, G. M., Beaver, J. A., Cochran, R. L., Blair, B. G., Rosen, D. M., Erlanger, B., Argani, P., Hurley, P. J., Lauring, J., ... Performed Research, P. J. H. (2014). *MACROD2 overexpression mediates estrogen independent growth and tamoxifen resistance in breast cancers*. 111(49), 17606–17611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408650111>
- Mollica, V., Di Nunno, V., Cimadamore, A., Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Santoni, M., Scarpelli, M., Montironi, R., & Massari, F. (2019). Molecular Mechanisms Related to Hormone Inhibition Resistance in Prostate Cancer. *Cells*, 8(1), 43. <https://doi.org/10.3390/cells8010043>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 6, pp. 423–437). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Mottet, N., van den Bergh, R. C. N., Briers, E., Van den Broeck, T., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., Fanti, S., Fossati, N., Gandaglia, G., Gillessen, S., Grivas, N., Grummet, J., Henry, A. M., van der Kwast, T. H., Lam, T. B., Lardas, M., Liew, M., Mason, M. D., Moris,

- L., ... Cornford, P. (2021). EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer—2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. In *European Urology* (Vol. 79, Issue 2, pp. 243–262). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.09.042>
- Naji, L., Randhawa, H., Sohani, Z., Dennis, B., Lautenbach, D., Kavanagh, O., Bawor, M., Banfield, L., & Profetto, J. (2018). Digital rectal examination for prostate cancer screening in primary care: A systematic review and meta-analysis. In *Annals of Family Medicine* (Vol. 16, Issue 2, pp. 149–154). Annals of Family Medicine, Inc. <https://doi.org/10.1370/afm.2205>
- Nilsson, R. J. A., Balaj, L., Hulleman, E., Van Rijn, S., Pegtel, D. M., Walraven, M., Widmark, A., Gerritsen, W. R., Verheul, H. M., Vandertop, W. P., Noske, D. P., Skog, J., & Würdinger, T. (2011). Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*, 118(13), 3680–3683. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344408>
- Nimir, M., Ma, Y., Jeffreys, S. A., Opperman, T., Young, F., Khan, T., Ding, P., Chua, W., Balakrishnar, B., Cooper, A., De Souza, P., & Becker, T. M. (2019). Detection of AR-V7 in Liquid Biopsies of Castrate Resistant Prostate Cancer Patients: A Comparison of AR-V7 Analysis in Circulating Tumor Cells, Circulating Tumor RNA and Exosomes. *Cells*, 8(7), 688. <https://doi.org/10.3390/cells8070688>
- Nurden, A. T., & Pillois, X. (2018). ITGA2B and ITGB3 gene mutations associated with Glanzmann thrombasthenia. *Platelets*, 29(1), 98–101. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1371291>
- O’Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., Karakoc, E., MacKenzie, A. P., Ng, S. B., Baker, C., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Fisher, S. E., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature Genetics*, 43(6), 585–589. <https://doi.org/10.1038/ng.835>
- Olinski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Roszkowski, K., & Jaruga, P. (2002). Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 192–200. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00878-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00878-X)
- Owen, G. I., & Zelent, A. (2000). Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 57, Issue 5, pp. 809–827). Springer. <https://doi.org/10.1007/s000180050043>
- Pandey, P. R., Rout, P. K., Das, A., Gorospe, M., & Panda, A. C. (2019). RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)+ RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA. *Methods*, 155, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.10.022>
- Pardee, K. (2004). Nuclear Hormone Receptors, Metabolism, and Aging: What Goes Around Comes Around. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2004(47), re8–re8. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.47.re8>
- Peng, L., Yuan, X. Q., & Li, G. C. (2015). The emerging landscape of circular RNA ciRS-7 in



- cancer (Review). *Oncology Reports*, 33(6), 2669–2674. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3904>
- Pierorazio, P. M., Walsh, P. C., Partin, A. W., & Epstein, J. I. (2013). Prognostic Gleason grade grouping: Data based on the modified Gleason scoring system. *BJU International*, 111(5), 753–760. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11611.x>
- Pinkel, D., & Albertson, D. G. (2005). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nature Genetics*, 37(6S), S11–S17. <https://doi.org/10.1038/ng1569>
- Placke, T., Örgel, M., Schaller, M., Jung, G., Rammensee, H. G., Kopp, H. G., & Salih, H. R. (2012). Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Research*, 72(2), 440–448. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1872>
- Pomerantz, M. M., Shrestha, Y., Flavin, R. J., Regan, M. M., Penney, K. L., Mucci, L. A., Stampfer, M. J., Hunter, D. J., Chanock, S. J., Schafer, E. J., Chan, J. A., Taberero, J., Baselga, J., Richardson, A. L., Loda, M., Oh, W. K., Kantoff, P. W., Hahn, W. C., & Freedman, M. L. (2010). Analysis of the 10q11 Cancer Risk Locus Implicates MSMB and NCOA4 in Human Prostate Tumorigenesis. *PLoS Genetics*, 6(11), e1001204. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001204>
- Porkka, K. P., & Visakorpi, T. (2004). Molecular mechanisms of prostate cancer. In *European Urology* (Vol. 45, Issue 6, pp. 683–691). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.01.012>
- Powers, C. A., Mathur, M., Raaka, B. M., Ron, D., & Samuels, H. H. (1998). TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors. *Molecular Endocrinology*, 12(1), 4–18. <https://doi.org/10.1210/mend.12.1.0043>
- Qiu, M., Xia, W., Chen, R., Wang, S., Xu, Y., Ma, Z., Xu, W., Zhang, E., Wang, J., Fang, T., Hu, J., Dong, G., Yin, R., Wang, J., & Xu, L. (2018). The circular RNA circPRKCI promotes tumor growth in lung adenocarcinoma. *Cancer Research*, 78(11), 2839–2851. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2808>
- Qu, S., Yang, X., Li, X., Wang, J., Gao, Y., Shang, R., Sun, W., Dou, K., & Li, H. (2015). Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. In *Cancer Letters* (Vol. 365, Issue 2, pp. 141–148). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>
- Rahman, M., Miyamoto, H., & Chang, C. (2004). Androgen Receptor Coregulators in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 10, Issue 7, pp. 2208–2219). American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0746-3>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *Review World J Oncol*, 10(2), 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Rinckleb, A. E., Surowy, H. M., Luedeke, M., Varga, D., Schrader, M., Hoegel, J., Vogel, W., & Maier, C. (2012). The prostate cancer risk locus at 10q11 is associated with DNA repair capacity. *DNA Repair*, 11(8), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.05.003>
- Rivera, J., Lozano, M. L., Navarro-Núñez, L., & Vicente García, V. (2009). Platelet receptors

- and signaling in the dynamics of thrombus formation. In *Haematologica* (Vol. 94, Issue 5, pp. 700–711). Haematologica. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.003178>
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., Montgomery, B., Taplin, M. E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
- Robitaille, J., & Langlois, V. S. (2020). Consequences of steroid-5 $\alpha$ -reductase deficiency and inhibition in vertebrates. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 290, p. 113400). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113400>
- Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: Integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. In *Cellular Signalling* (Vol. 15, Issue 4, pp. 355–366). [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00115-8)
- Roehrborn, C. G., & Rosen, R. C. (2008). Medical therapy options for aging men with benign prostatic hyperplasia: Focus on alfuzosin 10 mg once daily. In *Clinical Interventions in Aging* (Vol. 3, Issue 3, pp. 511–524). Dove Press. <https://doi.org/10.2147/cia.s3635>
- Rowe, L. R., Thaker, H. M., Opitz, J. M., Schiffman, J. D., Haddadin, Z. M., Erickson, L. K., & South, S. T. (2013). Molecular inversion probe array for the genetic evaluation of stillbirth using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Molecular Diagnostics*, 15(4), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.03.006>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2), 49–63. <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Rybak, A. P., Bristow, R. G., & Kapoor, A. (2015). Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6(4), 1900–1919. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2953>
- Sahu, B., Laakso, M., Pihlajamaa, P., Ovaska, K., Sinielnikov, I., Hautaniemi, S., & Jänne, O. A. (2013). FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 73(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2350>
- Salinas, C. A., Tsodikov, A., Ishak-Howard, M., & Cooney, K. A. (2014). Prostate cancer in young men: An important clinical entity. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 317–323). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.91>
- Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O. (2012). Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types. *PLoS ONE*, 7(2), e30733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030733>
- Saramäki, O. R., Porkka, K. P., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2006). Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. *International Journal of Cancer*, 119(6), 1322–1329. <https://doi.org/10.1002/ijc.21976>



- Saramaki, O., & Visakorpi, T. (2007). Chromosomal aberrations in Prostate cancer. *Frontiers in Bioscience*, 12(9), 3287–3301. <https://doi.org/10.2741/2312>
- Schulz, W. A., Burchardt, M., & Cronauer, M. V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*, 9(8), 437–448. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAG064>
- Selman, S. H. (2011). The McNeal prostate: A review. In *Urology* (Vol. 78, Issue 6, pp. 1224–1228). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.07.1395>
- Setlur, S. R., Royce, T. E., Sboner, A., Mosquera, J. M., Demichelis, F., Hofer, M. D., Mertz, K. D., Gerstein, M., & Rubin, M. A. (2007). Integrative microarray analysis of pathways dysregulated in metastatic prostate cancer. *Cancer Research*, 67(21), 10296–10303. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2173>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40>
- Sharp, A., Coleman, I., Yuan, W., Sprenger, C., Dolling, D., Rodrigues, D. N., Russo, J. W., Figueiredo, I., Bertan, C., Seed, G., Riisnaes, R., Uo, T., Neeb, A., Welti, J., Morrissey, C., Carreira, S., Luo, J., Nelson, P. S., Balk, S. P., ... Plymate, S. R. (2019a). Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 129(1). <https://doi.org/10.1172/JCI122819>
- Sharp, A., Coleman, I., Yuan, W., Sprenger, C., Dolling, D., Rodrigues, D. N., Russo, J. W., Figueiredo, I., Bertan, C., Seed, G., Riisnaes, R., Uo, T., Neeb, A., Welti, J., Morrissey, C., Carreira, S., Luo, J., Nelson, P. S., Balk, S. P., ... Plymate, S. R. (2019b). Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 192–208. <https://doi.org/10.1172/JCI122819>
- Simoncini, T., & Genazzani, A. R. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. In *European Journal of Endocrinology* (Vol. 148, Issue 3, pp. 281–292). <https://doi.org/10.1530/eje.0.1480281>
- Sinha, A. A., Wilson, M. J., & Gleason, D. F. (1987). Immunoelectron microscopic localization of prostatic-specific antigen in human prostate by the protein a-gold complex. *Cancer*, 60(6), 1288–1293. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19870915\)60:6<1288::AID-CNCR2820600621>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870915)60:6<1288::AID-CNCR2820600621>3.0.CO;2-V)
- Smith, D. F., & Toft, D. O. (2008). The intersection of steroid receptors with molecular chaperones: Observations and questions. In *Molecular Endocrinology* (Vol. 22, Issue 10, pp. 2229–2240). <https://doi.org/10.1210/me.2008-0089>
- So, A. I., Hurtado-Coll, A., & Gleave, M. E. (2003). Androgens and prostate cancer. In *World Journal of Urology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 325–337). <https://doi.org/10.1007/s00345-003-0373-9>
- Soda, N., Rehm, B. H. A., Sonar, P., Nguyen, N. T., & Shiddiky, M. J. A. (2019). Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. In *Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 7, Issue 43, pp. 6670–6704). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9tb01490j>
- Sol, N., & Wurdinger, T. (2017). Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer and*

- Metastasis Reviews*, 36(2), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9674-0>
- Song, X., Zeng, Z., Wei, H., & Wang, Z. (2018). Alternative splicing in cancers: From aberrant regulation to new therapeutics. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 75, pp. 13–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.018>
- Sridhar, S. S., Freedland, S. J., Gleave, M. E., Higano, C., Mulders, P., Parker, C., Sartor, O., & Saad, F. (2014). Castration-resistant prostate cancer: From new pathophysiology to new treatment. In *European Urology* (Vol. 65, Issue 2, pp. 289–299). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.008>
- Srigley, J. R., Delahunt, B., Egevad, L., Samaratunga, H., Yaxley, J., & Evans, A. J. (2016). One is the new six: The International Society of Urological Pathology (ISUP) patient-focused approach to Gleason grading. In *Canadian Urological Association Journal* (Vol. 10, Issues 9–10, pp. 339–341). Canadian Urological Association. <https://doi.org/10.5489/cuaj.4146>
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., & Redwine, E. (1987). Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *New England Journal of Medicine*, 317(15), 909–916. <https://doi.org/10.1056/NEJM198710083171501>
- Stancik, I., Lüftenecker, W., Klimpfing, M., Müller, M. M., & Hoeltl, W. (2004). Effect of NIH-IV prostatitis on free and free-to-total PSA. *European Urology*, 46(6), 760–764. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.08.003>
- Starke, S., Jost, I., Rossbach, O., Schneider, T., Schreiner, S., Hung, L. H., & Bindereif, A. (2015). Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Reports*, 10(1), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.002>
- Sturge, J., Caley, M. P., & Waxman, J. (2011). Bone metastasis in prostate cancer: Emerging therapeutic strategies. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 357–368). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.67>
- Sun, J., Hsu, F. C., Turner, A. R., Zheng, S. L., Chang, B. L., Liu, W., Isaacs, W. B., & Xu, J. (2006). Meta-analysis of association of rare mutations and common sequence variants in the MSRI gene and prostate cancer risk. *Prostate*, 66(7), 728–737. <https://doi.org/10.1002/pros.20396>
- Tachibana, M. (2000). MITF: A stream flowing for pigment cells. In *Pigment Cell Research* (Vol. 13, Issue 4, pp. 230–240). Pigment Cell Res. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130404.x>
- Tagawa, S. T., Antonarakis, E. S., Gjyrezi, A., Galletti, G., Kim, S., Worroll, D., Stewart, J., Zaher, A., Szatrowski, T. P., Ballman, K. V., Kita, K., Tasaki, S., Bai, Y., Portella, L., Kirby, B. J., Saad, F., Eisenberger, M. A., Nanus, D. M., & Giannakakou, P. (2019). Expression of AR-V7 and ARV 567Es in circulating tumor cells correlates with outcomes to taxane therapy in men with metastatic prostate cancer treated in taxynergy. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1880–1888. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0320>
- Taichman, R. S., Loberg, R. D., Mehra, R., & Pienta, K. J. (2007). The evolving biology and

- treatment of prostate cancer. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 117, Issue 9, pp. 2351–2361). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI31791>
- Taplin, M. E., & Ho, S.-M. (2001). The Endocrinology of Prostate Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(8), 3467–3477. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7782>
- Thadani-Mulero, M., Portella, L., Sun, S., Sung, M., Matov, A., Vessella, R. L., Corey, E., Nanus, D. M., Plymate, S. R., & Giannakakou, P. (2014). Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Research*, 74(8), 2270–2282. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2876>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thomas, C., Zoubeidi, A., Kuruma, H., Fazli, L., Lamoureux, F., Beraldi, E., Monia, B. P., MacLeod, A. R., Thüroff, J. W., & Gleave, M. E. (2011). Transcription factor stat5 knockdown enhances androgen receptor degradation and delays castration-resistant prostate cancer progression in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(2), 347–359. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0850>
- Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., & Coltman, C. A. (2004). Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level  $\leq 4.0$  ng per Milliliter. *New England Journal of Medicine*, 350(22), 2239–2246. <https://doi.org/10.1056/nejmoa031918>
- Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J. E., Shah, R. B., Pienta, K. J., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310(5748), 644–648. <https://doi.org/10.1126/science.1117679>
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., Wasielewska, T., Welsbie, D., Chen, C. D., Higano, C. S., Beer, T. M., Hung, D. T., Scher, H. I., Jung, M. E., & Sawyers, C. L. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 324(5928), 787–790. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>
- Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2016). Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–19). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0418-8>
- Valcarcel-Jimenez, L., Macchia, A., Martín-Martín, N., Cortazar, A. R., Schaub-Clerigué, A., Pujana-Vaquero, M., Fernández-Ruiz, S., Lacasa-Viscasillas, I., Santos-Martin, A., Loizaga-Iriarte, A., Unda-Urzaiz, M., Hermanova, I., Astobiza, I., Graupera, M., Starkova, J., Sutherland, J., Barrio, R., Aransay, A. M., Carracedo, A., & Torrano, V. (2018). Integrative analysis of transcriptomics and clinical data uncovers the tumor-suppressive activity of MITF in prostate cancer. *Cell Death and Disease*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1096-6>

- Vallejos, J., Villaronga, A., Álvarez, C., Mariluis, C., Paganini, L., González, C., De Luca, S., & Dieguez, A. (2013). Actualización de la estadificación del cáncer de próstata. *Revista Argentina de Radiología*, 77(4), 301–305. <https://doi.org/10.7811/rarv77n4a10>
- Vander Griend, D. J., D'Antonio, J., Gurel, B., Antony, L., DeMarzo, A. M., & Isaacs, J. T. (2010). Cell-autonomous intracellular androgen receptor signaling drives the growth of human prostate cancer initiating cells. *Prostate*, 70(1), 90–99. <https://doi.org/10.1002/pros.21043>
- Vasioukhin, V. (2004). Hepsin paradox reveals unexpected complexity of metastatic process. In *Cell Cycle* (Vol. 3, Issue 11, pp. 1394–1397). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.3.11.1273>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 379–386). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Vis, A. N., & Schröder, F. H. (2009). Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 2: The androgen receptor and 5 $\alpha$ -reductase. *BJU International*, 104(9), 1191–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1538-4632.1987.tb00119.x>
- Vo, J. N., Cieslik, M., Zhang, Y., Shukla, S., Xiao, L., Zhang, Y., Wu, Y. M., Dhanasekaran, S. M., Engelke, C. G., Cao, X., Robinson, D. R., Nesvizhskii, A. I., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell*, 176(4), 869–881.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.021>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Wadosky, K. M., & Koochekpour, S. (2017). Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget*, 8(11), 18550–18576. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14537>
- Wallaert, A., Durinck, K., Taghon, T., Van Vlierberghe, P., & Speleman, F. (2017). T-ALL and thymocytes: A message of noncoding RNAs. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–17). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0432-0>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. In *Genes and Development* (Vol. 32, Issues 17–18, pp. 1105–1140). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Wang, M., Yu, F., Wu, W., Zhang, Y., Chang, W., Ponnusamy, M., Wang, K., & Li, P. (2017). Circular RNAs: A novel type of non-coding RNA and their potential implications in antiviral immunity. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1497–1506). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22531>
- Wang, Y., Gong, C., Wang, X., & Qin, M. (2017). AR mutations in 28 patients with androgen insensitivity syndrome (Prader grade 0–3). *Science China Life Sciences*, 60(7), 700–706. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9084-9>
- Ware, K. E., Garcia-Blanco, M. A., Armstrong, A. J., & Dehm, S. M. (2014). Biologic and clinical

- significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 21, Issue 4, pp. T87–T103). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0470>
- Watson, P. A., Arora, V. K., & Sawyers, C. L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 12, pp. 701–711). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc4016>
- Watson, P. A., Chen, Y. F., Balbas, M. D., Wongvipat, J., Socci, N. D., Viale, A., Kim, K., & Sawyers, C. L. (2010). Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 16759–16765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012443107>
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 28(4), 390–406. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12370>
- Witte, J. S. (2009). Prostate cancer genomics: Towards a new understanding. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 10, Issue 2, pp. 77–82). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg2507>
- Wong, C. P., Bray, T. M., & Ho, E. (2009). Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. *Cancer Letters*, 276(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.025>
- Xiao, Q., Wang, L., Supekar, S., Shen, T., Liu, H., Ye, F., Huang, J., Fan, H., Wei, Z., & Zhang, C. (2020). Structure of human steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 with the anti-androgen drug finasteride. *Nature Communications*, 11(1), 5430. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19249-z>
- Xing, S., Zeng, T., Xue, N., He, Y., Lai, Y. Z., Li, H. L., Huang, Q., Chen, S. L., & Liu, W. L. (2019). Development and validation of tumor-educated blood platelets integrin Alpha 2b (ITGA2B) RNA for diagnosis and prognosis of non-small-cell lung cancer through RNA-seq. *International Journal of Biological Sciences*, 15(9), 1977–1992. <https://doi.org/10.7150/ijbs.36284>
- Xu, J., & Qiu, Y. (2016). Role of androgen receptor splice variants in prostate cancer metastasis. In *Asian Journal of Urology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 177–184). Editorial Office of Asian Journal of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2016.08.003>
- Yang, J., Zhao, Y. L., Wu, Z. Q., Si, Y. L., Meng, Y. G., Fu, X. B., Mu, Y. M., & Han, W. D. (2009). The single-macro domain protein LRP16 is an essential cofactor of androgen receptor. *Endocrine-Related Cancer*, 16(1), 139–153. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0150>
- Yang, S., Sun, Z., Zhou, Q., Wang, W., Wang, G., Song, J., Li, Z., Zhang, Z., Chang, Y., Xia, K., Liu, J., & Yuan, W. (2018). microRNAs, long noncoding RNAs, and circular RNAs: Potential tumor biomarkers and targets for colorectal cancer. In *Cancer Management and Research* (Vol. 10, pp. 2249–2257). Dove Medical Press Ltd.

- <https://doi.org/10.2147/CMAR.S166308>
- Yeh, Y.-T., Dai, H.-Y., & Chien, C.-Y. (2014). Amplification of MPZL1/PZR gene in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 3(2), 87–90. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.02.06>
- Yin, W. B., Yan, M. G., Fang, X., Guo, J. J., Xiong, W., & Zhang, R. P. (2018). Circulating circular RNA hsa\_circ\_0001785 acts as a diagnostic biomarker for breast cancer detection. *Clinica Chimica Acta*, 487, 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.10.011>
- Yu, E. Y., Miller, K., Nelson, J., Gleave, M., Fizazi, K., Moul, J. W., Nathan, F. E., & Higano, C. S. (2012). Detection of previously unidentified metastatic disease as a leading cause of screening failure in a phase III trial of zibotentan versus placebo in patients with nonmetastatic, castration resistant prostate cancer. *Journal of Urology*, 188(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.03.008>
- Yuan, S. M., Zhang, Y. N., Du, J., Li, W., Tu, C. F., Meng, L. L., Lin, G., Lu, G. X., & Tan, Y. Q. (2018). Phenotypic and molecular characteristics of androgen insensitivity syndrome patients. *Asian Journal of Andrology*, 20(5), 473–478. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_17\\_18](https://doi.org/10.4103/aja.aja_17_18)
- Zaslavsky, A. B., Gloeckner-Kalousek, A., Adams, M., Putluri, N., Venghatakrishnan, H., Li, H., Morgan, T. M., Feng, F. Y., Tewari, M., Sreekumar, A., & Palapattu, G. S. (2015). Platelet-synthesized testosterone in men with prostate cancer induces androgen receptor signaling. *Neoplasia (United States)*, 17(6), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.05.003>
- Zhang, T., Karsh, L. I., Nissenblatt, M. J., & Canfield, S. E. (2020). Androgen Receptor Splice Variant, AR-V7, as a Biomarker of Resistance to Androgen Axis-Targeted Therapies in Advanced Prostate Cancer. In *Clinical Genitourinary Cancer* (Vol. 18, Issue 1, pp. 1–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2019.09.015>
- Zhang, Z., Xie, Q., He, D., Ling, Y., Li, Y., Li, J., & Zhang, H. (2018). Circular RNA: New star, new hope in cancer. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4689-7>
- Zhao, F., Li, L., Guan, L., Yang, H., Wu, C., & Liu, Y. (2014). Roles for GP IIb/IIIa and  $\alpha\beta 3$  integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. *Cancer Letters*, 344(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.019>
- Zhou, D., Kannappan, V., Chen, X., Li, J., Leng, X., Zhang, J., & Xuan, S. (2016). RBP2 induces stem-like cancer cells by promoting EMT and is a prognostic marker for renal cell carcinoma. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(6), e238. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.37>
- Zhu, Y., & Luo, J. (2020). Regulation of androgen receptor variants in prostate cancer. In *Asian Journal of Urology*. Editorial Office of Asian Journal of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2020.01.001>