



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

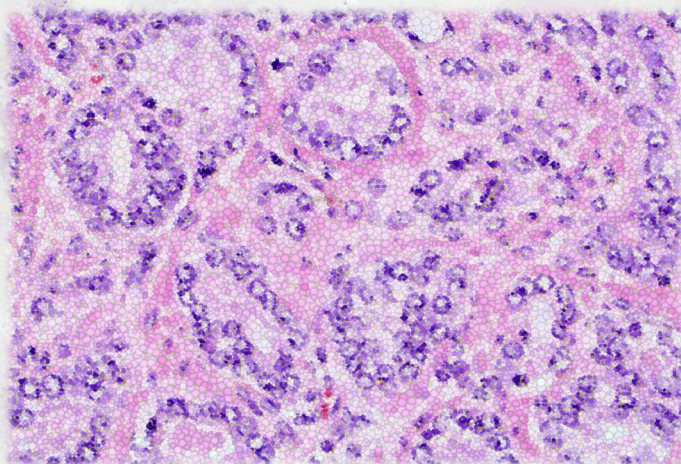
Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Ciències Morfològiques

2019

**Estudi immunohistoquímic de les proteïnes reparadores
de l'ADN MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2
en càncer de pròstata**



Tesi doctoral

Raquel Alberó González

Directors: Dr. Josep Lloreta Trull
Dra. Silvia Hernández Llodrà

Tutora: Dra. Inés de Torres Ramírez



FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIRURGIA I CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

**ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC DE LES PROTEÏNES REPARADORES DE
L'ADN MSH2, MSH6, MLH1 I PMS2 EN CÀNCER DE PRÒSTATA**

Memòria de tesi doctoral presentada per **Raquel Albero González** per optar al títol de
Doctora en Medicina per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball s'ha realitzat al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari
Parc de Salut Mar dins del Grup de Recerca en Càncer Urològic, sota la co-direcció dels
Drs. Josep Lloreta Trull i Silvia Hernández Llodrà.

Doctoranda	Co-director	Co-directora	Tutora acadèmica
Raquel Albero González	Josep Lloreta Trull	Silvia Hernández Llodrà	Inés de Torres Ramírez

Barcelona, juny del 2019

El Dr. Josep Lloreta Trull, Catedràtic de la Universitat Pompeu Fabra i Cap de Secció del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Parc de Salut Mar, i la Dra. Silvia Hernández Llodrà, Professora titular d'Histologia al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut de la Universitat Pompeu Fabra i Biòloga Molecular al Grup de Recerca en Càncer Genito-Urinari de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM),

CERTIFIQUEN:

Que la tesi doctoral titulada **“Estudi immunohistoquímic de les proteïnes reparadores de l'ADN MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 en càncer de pròstata”**, presentada per Raquel Alberó González, per tal d'accedir al títol de Doctora en Medicina, ha estat realitzada sota la seva co-direcció, estimant que reuneix els requisits formals i científics adients per la seva preceptiva lectura i defensa públiques.

I per a que així consti, i als efectes oportuns, signem la present certificació a Barcelona, a juny del 2019.

Directors de la tesi:

Dr. Josep Lloreta Trull

Dra. Silvia Hernández Llodrà

Departament d'Anatomia Patològica,
Parc de Salut Mar de Barcelona

Departament d'Anatomia Patològica,
Parc de Salut Mar de Barcelona

A l'Oriol i al nostre fill Uriel

Als meus pares José Luis i Núria i als meus avis

“Mai consideris l’estudi com una obligació, sinó com l’oportunitat de penetrar en el bell i meravellós món del saber”

Albert Einstein

ÍNDEX

ÍNDEX	13
Llista d'abreviacions.....	19
Llista de figures.....	21
Llista de taules.....	23
1. INTRODUCCIÓ	25
1. 1. Anatomia, histologia i fisiologia de la pròstata	27
1. 2. Patologia de la pròstata	28
1. 2. 1. Lesions benignes: hiperplàsia prostàtica.....	28
1. 2. 2. Lesions pre-malignes: neoplàsia intraepitelial prostàtica.....	29
1. 2. 3. Lesions malignes: càncer de pròstata.....	30
1. 3. Epidemiologia del càncer de pròstata	34
1. 3. 1. Incidència i distribució geogràfica.....	34
1. 3. 2. Mortalitat.....	34
1. 3. 3. Edat.....	35
1. 3. 4. Història natural del càncer de pròstata.....	35
1. 3. 5. Impacte econòmic.....	37
1. 4. Característiques clínic-patològiques del càncer de pròstata	38
1. 4. 1. Classificació segons grups pronòstics: OMS 2016.....	38
1. 4. 2. Sistema d'estadiatge patològic: classificació TNM (AJCC 8th Edition, 2017)....	40
1. 5. Diagnòstic del càncer de pròstata	42
1. 5. 1. Tacte rectal.....	42
1. 5. 2. PSA.....	43
1. 5. 3. Diagnòstic per imatge.....	44
1. 5. 4. Biòpsia prostàtica.....	44
1. 5. 4. 1. Immunohistoquímica.....	46
1. 6. Tractament del càncer de pròstata	47
1. 6. 1. Tractament quirúrgic - Prostatectomia radical.....	47
1. 6. 2. Tractament adjuvant del càncer de pròstata - Radioteràpia.....	47
1. 6. 3. Hormonoteràpia i quimioteràpia.....	47
1. 6. 4. Tractament segons estadiatge.....	48

1. 6. 5. Recidiva bioquímica	48
1. 7. Pronòstic i factors predictius del càncer de pròstata	49
1. 8. Característiques moleculars del càncer de pròstata i carcinogènesi prostàtica	51
1. 8. 1. Gens de fusió: tumors “ETS-positius”	53
1. 8. 2. Tumors “ETS-negatius”	57
1. 8. 3. Desenvolupament prostàtic i regulació androgènica	58
1. 8. 4. Vies clàssiques de regulació i senyalització cel·lular	60
1. 8. 4. 1. Via PI3K-AKT	60
1. 8. 4. 2. Via MAPK-ERK	62
1. 8. 4. 3. TP53, KLF6 i Retinoblastoma	62
1. 8. 5. Gens reparadors de l’ADN: <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MLH1</i> i <i>PMS2</i>	63
1. 8. 5. 1. Defectes dels gens <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MLH1</i> i <i>PMS2</i> i càncer de pròstata	64
1. 8. 6. Càncer de pròstata hereditari	66
1. 8. 6. 1. Altres gens reparadors de l’ADN: <i>BRCA</i>	67
1. 8. 6. 2. Síndrome de Lynch	67
1. 8. 6. 2. 1. Càncer de pròstata i Síndrome de Lynch	68
2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	69
2. 1. Hipòtesis del treball	71
2. 2. Objectius del treball	71
3. MATERIALS I MÈTODES	73
3. 1. Selecció de casos	75
3. 2. Característiques histopatològiques dels tumors	76
3. 3. Estudi immunohistoquímic sobre matrius tissulars	76
3. 3. 1. Construcció de les matrius de teixit	76
3. 3. 2. Estudi immunohistoquímic	77
3. 3. 3. Lectura immunohistoquímica de les matrius tissulars	78
3. 4. Anàlisi estadística	79
3. 5. Anàlisi de supervivència	80
4. RESULTATS	81
4. 1. Característiques clíniques dels pacients	83

4. 2. Característiques histopatològiques dels tumors	84
4. 3. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2), i les proteïnes ERG i PTEN en càncer de pròstata	85
4. 4. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 i la variable "grup de grau" (OMS 2016) en càncer de pròstata	87
4. 4. 1. Expressió de la proteïna MSH6 segons la variable "grup de grau" agrupada en clústers	90
4. 4. 2. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i la variable "grup de grau" en càncer de pròstata	91
4. 5. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1 i l'estatus d'ERG en càncer de pròstata	92
4. 5. 1. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i l'estatus d'ERG	93
4. 6. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1 i l'estatus de PTEN en càncer de pròstata	93
4. 6. 1. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i l'estatus de PTEN	95
5. DISCUSSIÓ	97
5. 1. Càncer de pròstata i expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2	100
5. 2. Relació de l'expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 amb l'estatus d'ERG i PTEN	106
5. 3. Expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 i anàlisi de supervivència (veure Annex 1)	108
5. 4. Limitacions de l'estudi	110
5. 5. Futures línies de recerca i altres consideracions.....	111
6. CONCLUSIONS	113
7. BIBLIOGRAFIA	117
8. ANNEX	139
8. 1. Annex 1: Anàlisi de supervivència: Corbes de Kaplan – Meier	141
9. AGRAÏMENTS	147

LLISTA D'ABREVIACIONS

ADC, ADCs: Adenocarcinoma, adenocarcinomes

AR: Receptor d'Androgen (de l'anglès *Androgen Receptor*)

CAP: *College of American Pathologists*

CaPr: Càncer de pròstata

CEIC: Comitè Ètic d'Investigació Clínica

CNA: *Copy Number Alterations*

DHT: Dihidrotestosterona

EMT: Transició Epiteli Mesènquima (de l'anglès *Epithelial Mesenchymal Transition*)

EUA: Estats Units d'Amèrica

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*

fPSA: Antigen Prostàtic Específic Lliure (de l'anglès *Free Prostate Specific Antigen*)

GG: "Grup de grau"

GS: Grau de Gleason (de l'anglès *Gleason Score*)

HBP: Hiperplàsia Benigna de Pròstata

HGPIN: Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica d'alt grau (de l'anglès *High Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia*)

H&E: Hematoxilina-Eosina

IHQ: Immunohistoquímica

IMS: Inestabilitat de microsatèl·lits

ISUP: *International Society of Urological Pathology*

IVS: Invasió de les vesícules seminals

mARN: ARN missatger

MLHs: Homòlegs MutL

MRI: Ressonància Magnètica (de l'anglès *Magnetic Resonance Imaging*)

MSHs: Homòlegs MutS

NGS: De l'anglès *Next-Generation Sequencing*

NV: No valorables

OMS: Organització Mundial de la Salut

PIN: Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica (de l'anglès *Prostate Intraepithelial Neoplasia*)

PMS2: *Post-Meiotic Segregation 2*

PR: Prostatectomia Radical

PSA: Antigen Prostàtic Específic (de l'anglès *Prostate Specific Antigen*)

pTNM: De l'anglès *Pathological Tumor-Node-Metastasis Staging*

RT: Radioteràpia

RTUp: Resecció Transuretral Prostàtica

Sistema MMR: Sistema de reparació d'errors de l'emparellament de l'ADN (de l'anglès *Mismatch Repair System*)

SL: Síndrome de Lynch

TMA: Matrius tissulars (de l'anglès *Tissue Microarrays*)

TR: Tacte rectal

UC, UCs: Carcinoma urotelial, carcinomes urotelials (de l'anglès *Urothelial Carcinoma*)

VA: Vigilància activa

wt: De l'anglès *Wild type*, considerat com a "natural"

LLISTA DE FIGURES

Figura 1: Anatomia de la glàndula prostàtica i predisposició a diferents patologies segons regions anatòmiques.

Figura 2: Imatge histològica d'adenocarcinoma prostàtic acinar convencional.

Figura 3: Diagrames esquemàtics: evolució del sistema de gradació de Gleason en càncer de pròstata.

Figura 4: Distribució dels costos totals relatius a tractament inicial per pacient a Regne Unit, Alemanya, França, Itàlia i Espanya.

Figura 5: Classificació histològica del sistema complementari de gradació del càncer de pròstata basat en els "grups de grau".

Figures 6a-d: Definicions de tumor primari (T) de la classificació clínica (6a) i patològica (6b) d'estadiatge de càncer de pròstata, i definicions de l'afectació dels ganglis limfàtics regionals (N) (6c) i metàstasis a distància (M) (6d) (AJCC 8th Edition, 2017).

Figura 7: Estratificació del càncer de pròstata en grups de risc de la NCCN®.

Figura 8: Evolució genòmica del càncer de pròstata, des de l'epiteli normal fins al càncer refractari a tractament hormonal i metastàtic.

Figura 9: Complexitat de les fusions genètiques de la família ETS i possibles variants.

Figura 10: Sistema de reparació d'errors de l'emparellament de l'ADN.

Figura 11: Esquema de funcionament dels diferents heterodímers que constitueixen el sistema reparador d'errors de l'emparellament de l'ADN.

Figura 12: Imatges representatives de la immunotinció de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) a l'epiteli prostàtic benigne (x40 i x150).

Figures 13a-b: Exemples d'immunotincions de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 en càncer de pròstata (x200).

Figura 14: Exemple d'immunotinció positiva de la proteïna ERG (x50) en un cas amb un GS = 3 + 3 (GG1).

Figures 15a-b: Exemples d'immunotincions de la proteïna PTEN (x50) en càncer de pròstata.

Figures 16a-f (Annex 1, Apartat 8.1): Corbes de supervivència de Kaplan-Meier segons la classificació GG (16a) i comparant els pacients amb i sense pèrdua d'expressió (*wt*) de les proteïnes reparadores de l'ADN: MSH2 (16b), MLH1 (16d), PMS2 (16e). Les figures (16c) i (16f) mostren les corbes de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb sobreexpressió de MSH6 *vs* pacients amb MSH6 a nivells basals (*wt*), i els pacients amb sobreexpressió de MSH6 *vs* pacients amb MSH6 a nivells basals (*wt*) en categoria GG5.

Figures 17a-b (Annex 1, Apartat 8.1): Corbes de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb pèrdua de MLH1 i/o MSH2 *vs* pacients MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.656$) (17a) i aquells pacients amb doble pèrdua d'expressió de MLH1 i MSH2 *vs* pacients MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.335$) (17b).

Figures 18a-b (Annex 1, Apartat 8.1): Corbes de supervivència de Kaplan-Meier comparant els tumors ERG-positius (MSH2 perdut o *wt*) *vs* MSH2 perdut/ERG *wt* *vs* MSH2/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.679$) (18a) i ERG-positius (MSH2 i/o MLH1 perduts o *wt*) *vs* MSH2 i/o MLH1 perduts/ERG *wt* *vs* MSH2/MLH1/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.797$) (18b).

LLISTA DE TAULES

Taula 1: Criteris d'inclusió dels casos a analitzar a l'estudi.

Taula 2: Proteïnes analitzades i característiques dels anticossos primaris utilitzats.

Taula 3: Resum de les característiques clíniques més rellevants.

Taula 4: Freqüència dels diferents GS dels adenocarcinomes prostàtics analitzats.

Taula 5: Freqüència dels diferents GG dels adenocarcinomes prostàtics analitzats.

Taula 6: Freqüència de les diferents variables immunohistoquímiques analitzades.

Taula 7: Prevalença de les alteracions de l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN, ERG i PTEN en càncer de pròstata segons la classificació GG (OMS 2016).

Taula 8: Prevalença de les alteracions de l'expressió de les proteïnes ERG i PTEN en càncer de pròstata segons la classificació GG (OMS 2016) agrupats en tres clústers (GG1, GG2-4 vs GG5).

Taula 9: Expressió nuclear basal i sobreexpressió de la proteïna MSH6 segons els GG agrupats en dos clústers (GG1-4 vs GG5).

Taula 10: Relació entre les alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus d'ERG.

Taula 11: Relació entre les alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus de PTEN.

1. INTRODUCCIÓ

1. 1. Anatomia, histologia i fisiologia de la pròstata

La pròstata és la principal glàndula sexual al gènere masculí. En condicions normals, té un pes aproximat de 20 grams i unes dimensions de 20 x 30 x 40 mm de gruix, llargària i amplada, respectivament.

Anatòmicament, de forma macroscòpica la pròstata es divideix en lòbuls. Histològicament, es distingeixen tres zones concèntriques que rodegen la part prostàtica de la uretra. La **zona central** i la de **transició** envolten la uretra i la **zona perifèrica**, de major mida, les envolta parcialment per la part posterior i postero-lateral. Aquesta divisió en regions també és de gran utilitat a nivell clínic ja que les lesions proliferatives que assenten a cadascuna d'aquestes àrees són també diferents, de forma que la majoria de lesions hiperplàsiques s'originen a la zona de transició, i, per contra, els canvis d'atròfia i la major part de les neoplàsies malignes (70-80%) ho fan a la zona perifèrica de la glàndula (**Figura 1**).

La glàndula prostàtica normal està constituïda per 40-50 glàndules túbuloalveolars, que buiden la seva secreció a 20 conductes excretors que, a la vegada, desemboquen a la uretra. Aquestes glàndules estan revestides per dues capes de cèl·lules, una plana de cèl·lules basals i una altra de cèl·lules cúbiques a cilíndriques suprajacents, responsables de la secreció. L'epiteli descansa sobre una membrana basal que es continua amb l'estroma fibro-muscular, l'altre component fonamental a nivell histològic. A la llum dels alvèols és característica la presència dels cossos amilacis, eosinòfils i de morfologia esfèrica, que estan formats per dipòsits glucoproteics que augmenten amb l'edat. Poden arribar a calcificar-se donant lloc als càlculs o concrecions.

De forma fisiològica, a la pubertat, l'epiteli glandular pateix una ràpida hiperplàsia i la pròstata duplica les seves dimensions. Aquestes modificacions són degudes a l'estimulació de la testosterona secretada per les cèl·lules de Leydig en quantitats creixents. La secreció prostàtica és un líquid fluid, que conté àcid cítric, fosfatasa àcida, antigen prostàtic específic (PSA), zinc i proteïna IgA, entre d'altres components, la funció principal dels quals és mantenir les propietats del semen.

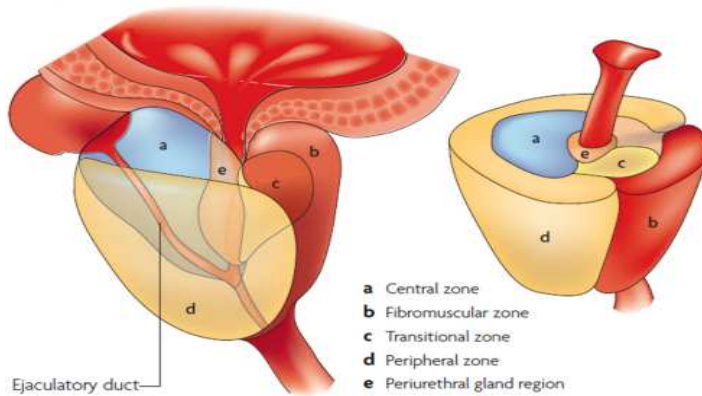


Tabla 1: Anatomia de la glàndula prostàtica i predisposició a diferents patologies segons regions anatòmiques [1].

	Prostate zone		
	Peripheral	Transition	Central
Focal atrophy	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Acute inflammation	Low prevalence	None	Low prevalence
Chronic inflammation	Medium-high prevalence	High prevalence	Low prevalence
Benign prostatic hyperplasia	None	High prevalence	Low prevalence
High-grade PIN	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Carcinoma	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence

1. 2. Patologia de la pròstata

1. 2. 1. Lesions benignes: hiperplàsia prostàtica

La hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) és una entitat clínicopatològica molt freqüent, que es presenta bàsicament a partir de la cinquena dècada de la vida i la incidència de la qual augmenta progressivament amb l'edat, arribant al 90% cap a la vuitena dècada.

Morfològicament, es caracteritza per una proliferació dels elements tant epitelials com estromals, fet que comporta un increment de les dimensions de la pròstata (60-100 g). Els nòduls poden tenir aspecte sòlid o contenir espais quístics corresponents a espais glandulars dilatats. Aquestes estructures glandulars hiperplàsiques es troben revestides per cèl·lules cilíndriques altes i una capa perifèrica de cèl·lules basals aplanades. De forma freqüent, la llum de les glàndules conté cossos amilacis.

Tot i que la causa de la HBP continua sense definir-se clarament, se sap que el substrat biològic d'aquesta és la regulació androgènica, que té un rol central en el creixement excessiu de la glàndula. La dihidrotestosterona (DHT), la principal hormona responsable del creixement prostàtic, es sintetitza a partir de la testosterona circulant mitjançant l'acció de l'enzim 5 α -reductasa tipus 2. La DHT s'uneix als receptors d'andrògens (AR) nuclears, que regulen l'expressió gènica i són responsables del creixement i la supervivència cel·lular.

Malgrat que la testosterona també es pot unir als AR, l'acció de la DHT és 10 vegades més potent.

La simptomatologia per l'obstrucció de la via urinària baixa, ocasionada per l'augment de mida de la pròstata, també es veu exacerbada per la contracció del teixit muscular llis present a l'estroma, i que és realitzada pels receptors adrenèrgics α_1 . Les manifestacions clíniques de la HBP es presenten en un percentatge minoritari dels homes que pateixen aquesta patologia. Com aquesta afecta preferentment a les àrees més centrals de la pròstata, els símptomes més freqüents són l'obstrucció de la via urinària baixa, en forma de dificultat per començar la micció, i interrupció intermitent del doll urinari durant aquesta. Altres símptomes acompanyants són la urgència miccional, la polaquiúria i nictúria, totes elles indicatives d'irritació vesical.

L'abordatge terapèutic inicial és farmacològic, bàsicament, amb inhibidors de la formació de DHT (finasterida) o bé, relaxadors de la musculatura llisa que bloquegen els receptors α -adrenèrgics (tamsulosina). Les tècniques quirúrgiques com la resecció transuretral prostàtica o l'adenomectomia es reserven per casos simptomàtics més greus que mostren resistència al tractament mèdic.

1. 2. 2. Lesions pre-malignes: neoplàsia intraepitelial prostàtica

La denominada neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN) és el precursor més probable del càncer de pròstata (CaPr). Als Estats Units d'Amèrica (EUA) anualment es realitzen més de 1.300.000 biòpsies d'agulla de pròstata amb una incidència mitja de neoplàsia intraepitelial prostàtica d'alt grau (HGPI) d'aproximadament el 7,7% [2], tot i que en alguns casos supera el 16% [3]. De fet, aquesta incidència augmenta amb l'edat dels pacients i està condicionada també per l'ètnia i la localització geogràfica, sent major en homes afro-americanos i significativament menor en asiàtics, particularment en japonesos [4]. Aquestes diferències racials en la incidència del PIN entre pacients de 50-60 anys d'edat constitueixen un reflex de les diferències observades al CaPr en pacients de 60-70 anys [5]. Clínicament, les troballes del HGPI són superposables a les d'un CaPr diagnosticat en una fase precoç. Anatòmicament, la HGPI assenta de forma més freqüent a la zona perifèrica i coexisteix amb CaPr en més del 85% dels casos d'acord amb alguns treballs com el de Qian J *et al.* [5], en què es va realitzar inclusió total de peces de prostatectomia radical. Tanmateix, les xifres varien considerablement d'un estudi a un altre.

La HGPIN acostuma a ser multifocal i es caracteritza per una proliferació neoplàsica de cèl·lules secretores, que revesteixen ductes i acins preexistents. Citològicament, presenta canvis semblants als detectats al càncer, com són un augment de la mida del nucli i la presència d'un o varis nuclèols prominents. Aquestes cèl·lules tot i que comparteixen trets morfològics, histoquímics, immunohistoquímics i moleculars amb el CaPr, es caracteritzen per no envair la membrana basal de les glàndules prostàtiques. S'han descrit quatre patrons principals de HGPIN: micropapil·lar, cribiforme, pla o "en plomalls" [6].

Tant al PIN com als focus d'adenocarcinoma (ADC) adjacents, s'han observat alguns canvis genètics similars, suggerint-se que existeix un espectre morfològic entre ambdues entitats, on progressivament es perdrien les cèl·lules de la capa basal al PIN i s'iniciaria la infiltració incipient de l'estroma en el cas del càncer. Tanmateix, resulta difícil establir de forma precisa aquesta seqüència morfològica existent entre HGPIN i el CaPr, ja que no és factible realitzar estudis longitudinals de mostres senceres de pròstata.

Algunes de les alteracions similars descrites entre ambdues entitats són la pèrdua d'heterozigositat a 8p12-21, 8p22, el guany dels cromosomes 7, 8, 10, 12 i 8p24, l'expressió de la proteïna ERG i la pèrdua de *PTEN* [7].

La importància clínica de reconèixer la HGPIN radica en la seva associació amb el carcinoma prostàtic, ja que la HGPIN constitueix un fort predictor de CaPr en les subseqüents biòpsies que es puguin realitzar. A la literatura, el risc mig de presentar CaPr després d'un diagnòstic de HGPIN a la biòpsia d'agulla és d'aproximadament un 24% [2]. Per aquest motiu, en pacients que presenten un diagnòstic de HGPIN multifocal, és a dir, més d'una biòpsia d'agulla amb HGPIN és recomanable realitzar un seguiment durant un any, mitjançant la realització de més biòpsies prostàtiques.

1. 2. 3. Lesions malignes: càncer de pròstata

El CaPr és la segona neoplàsia maligna més freqüent al sexe masculí, després del càncer cutani. Existeixen diferents factors implicats en la seva patogènia com són els andrògens, que són crucials en el desenvolupament del teixit prostàtic normal i cancerós, i afavoreixen el context cel·lular en què assentaran els tumors. El component genètic també contribueix de forma important, ja que el risc de CaPr augmenta significativament en familiars de primer grau de pacients amb aquests tumors. Així mateix, els hàbits dietètics relacionats amb l'estil de vida també s'han relacionat significativament amb aquesta neoplàsia. Hi ha evidències de

que certs carcinògens, estrògens i/o oxidants presents a la dieta podrien afavorir l'aparició d'infiltrats inflamatoris crònics, sobre els quals podria desenvolupar-se el càncer [1,8-10]. Tanmateix, la identificació de substàncies carcinogèniques específiques resulta complicat; tot i que estudis amb models animals recolzen que la carn vermella i els greixos animals estarien dins dels factors de risc d'aquests tumors. Altres factors ambientals potencialment relacionats són l'exposició a esteroides (estrògens) i agents infecciosos (*N. gonorrhoeae*, *Chlamydia*, *T. vaginalis*) [11,12]. D'aquesta forma, el dany epitelial i l'estrès oxidatiu persistent ocasionat per aquests agents i la resposta inflamatòria acompanyant constituïrien la via patogènica comuna entre els carcinògens ambientals i el desenvolupament del CaPr.

Anatòmicament, la majoria d'adenocarcinomes (ADCs) de pròstata (85-90%) són multifocals, amb una mitja de 2-3 tumors diferents per glàndula [13]. Aquests sorgeixen preferentment a la zona perifèrica posterior o postero-lateral (75-80%), tot i que degut al cribratge actual amb determinacions de PSA i la realització de biòpsies sistemàtiques, molts d'ells no són palpables i tot i així es diagnostiquen en fases precoces. A més, amb les actuals aproximacions diagnòstiques hi ha hagut un augment relatiu del diagnòstic de tumors dominants a zona perifèrica anterior [14,15], que més freqüentment afecten l'estroma fibromuscular i el coll vesical. La zona central es veu implicada típicament de forma secundària, ja que rarament els tumors s'originen en aquesta regió.

Morfològicament, la majoria de tumors detectats clínicament no són visibles de forma macroscòpica. Les lesions que ho són, s'identifiquen per presentar límits poc definits, coloració blanquinosa-groguenca i consistència indurada. A l'estudi histològic, gran part de les neoplàsies són diagnosticades com ADCs acinars, el tipus histològic més freqüent. Les glàndules malignes són de menors dimensions a les benignes, estan densament agrupades i revestides per una única capa de cèl·lules epitelials cúbiques o cilíndriques baixes. A diferència de l'epiteli glandular benigne, la capa de cèl·lules basals es perd al CaPr. Característicament, els nuclis estan augmentats de mida, són hipercromàtics, amb la presència característica de macronuclèol prominent (6-7 µm), escasses figures de mitosi i cossos apoptòtics. El citoplasma pot variar des d'amfòfil a pàl·lid. El contorn luminal és rígid i típicament s'observen continguts luminals (secrecions mucinoses o cristal·loides, que són estructures eosinofíliques denses que poden adquirir formes geomètriques). El pleomorfisme no és un tret histopatològic característic d'aquests tumors. A mesura que

disminueix el grau de diferenciació, s'aprecien estructures glandulars més irregulars, amb patró cribriforme, sòlid o bé, presència de cèl·lules aïllades infiltrants.

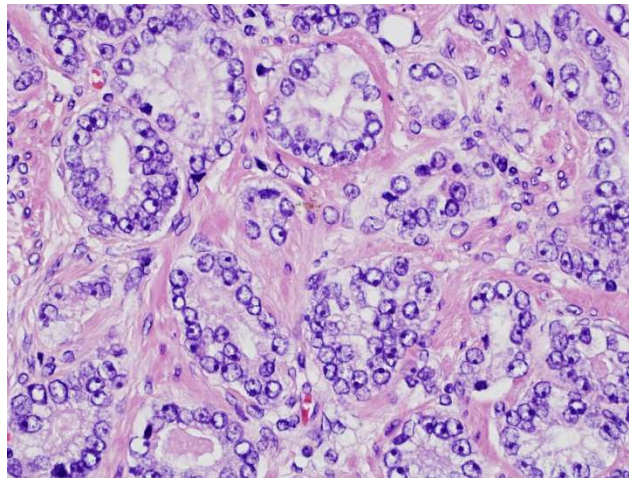


Figura 2: Imatge histològica d'adenocarcinoma prostàtic acinar convencional.

Hi ha tres criteris microscòpics que fins al moment no s'han descrit en glàndules benignes i que són sòlids pel diagnòstic de càncer: la fibroplàsia mucinosa (micronòduls col·làgens), les estructures glomeruloides i la invasió perineural. També existeixen variants histològiques de l'ADC acinar que presenten algunes diferències pronòstiques i poden generar dificultats diagnòstiques [16]. Les variants sarcomatoide, de cèl·lules gegants pleomòfiques i en anell de segell presenten un pitjor pronòstic que l'ADC acinar usual. Entre les variants que poden suposar un repte alhora de realitzar el diagnòstic s'inclouen la variant atròfica, microquística, pseudohiperplàsica i de glàndules espumoses.

La gradació del CaPr s'ha realitzat clàssicament utilitzant el sistema creat per Gleason D.F. al 1967 (**Figura 3**), segons el qual els tumors es graden en cinc graus de Gleason (GS) en funció dels patrons de diferenciació glandular [17]. D'aquesta forma, el grau 1 representa als tumors més ben diferenciats i el grau 5 aquells que no presenten diferenciació glandular.

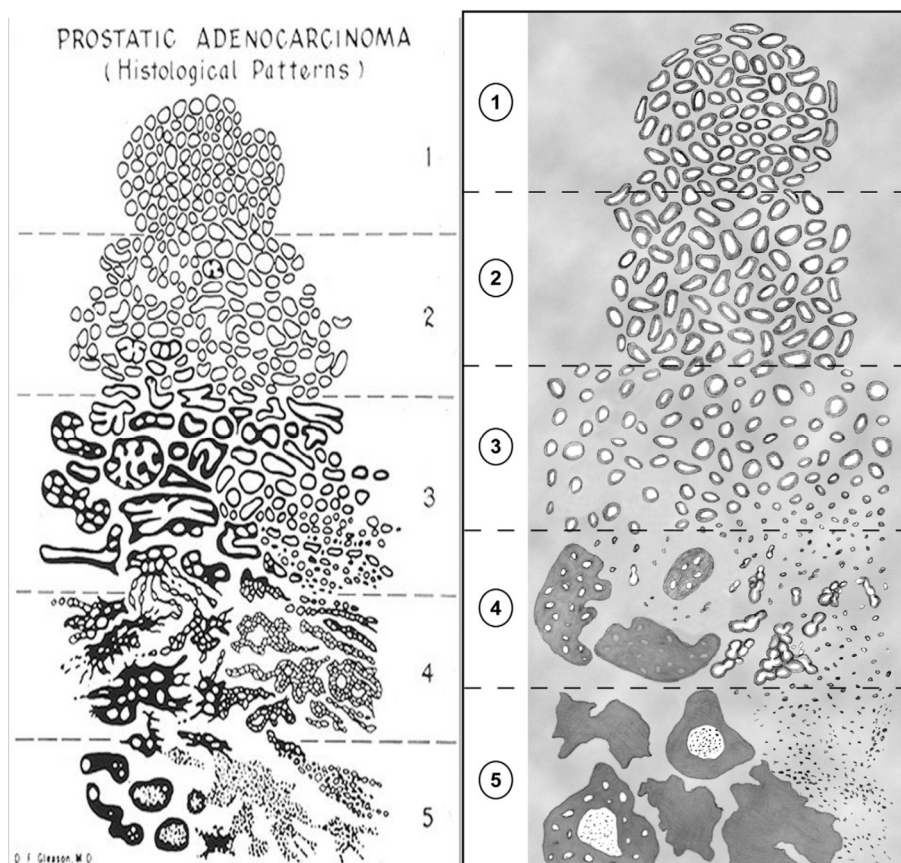


Figura 3: Diagrames esquemàtics que mostren l'evolució del sistema de gradació de Gleason en CaPr. A l'esquerra el sistema original definit per Gleason (1967) [17], a la dreta el sistema de Gleason modificat per la International Society of Urological Pathology (ISUP) (2005) [18].

Donat que les neoplàsies de pròstata usualment contenen més d'un patró, aquest sistema assigna un grau principal al patró dominant i un grau secundari al segon patró més freqüent, de forma que ambdós graus numèrics se sumen per tal d'obtenir el GS combinat. Les puntuacions de Gleason varien de 2 (1+1) en els casos més ben diferenciats, a 10 (5+5) en els més indiferenciats. A aquells tumors que únicament presenten un patró se'ls hi assigna el mateix valor com si el grau principal i el secundari fossin iguals.

L'espectre clínic-patològic és molt variable, definint-se un ventall molt ampli, des de lesions poc actives i indolents fins a pacients amb tumors de curs virulent que poden arribar a causar la mort. La malaltia clínicament significativa i agressiva és més freqüent en homes de raça negra que en els de raça blanca, tot i que els tumors de curs més indolent presenten una incidència similar en ambdues ètnies.

A l'actualitat, la majoria dels CaPr són lesions de petites dimensions, no palpables i asimptomàtiques, que són diagnosticades mitjançant biòpsies d'agulla realitzades davant d'una elevació persistent del PSA. Clínicament, es pot sospitar l'existència d'aquestes lesions per l'elevació sèrica del PSA i/o un tacte rectal patològic. Donat que el CaPr assenta més freqüentment a la zona perifèrica de la glàndula, és menys probable que ocasioni

obstrucció uretral en comparació amb la HBP. Les manifestacions clíniques sovint es produeixen quan la malaltia és avançada o metastàsica, en forma d'augment de la freqüència urinària, dificultat per miccionar, retenció aguda d'orina i hematúria, entre d'altres. Els tumors localment avançats sovint afecten també estructures veïnes com les vesícules seminals, teixits tous adjacents o la paret de la bufeta urinària. Típicament, les metàstasis són freqüents a ganglis limfàtics regionals (5-12% en pacients amb malaltia òrganoconfinada, Cai T *et al.* [19]) i esquelet axial, on de forma característica produeixen lesions osteoblàstiques i fractures patològiques.

1. 3. Epidemiologia del càncer de pròstata

1. 3. 1. Incidència i distribució geogràfica

El CaPr és la segona neoplàsia maligna més freqüent al sexe masculí amb una incidència estimada de 1,1 milions de nous casos al 2012, representant el 15% dels càncers diagnosticats en homes i amb pràcticament un 70% (759.000) reportant-se en les regions més desenvolupades. La incidència del CaPr varia considerablement arreu del món, i les proporcions més elevades es reporten a Austràlia/Nova Zelanda, Nord-Amèrica (111,6 i 97,2 per 100.000, respectivament) i Europa, concretament a les regions del Nord i Occident [7]. Aquesta distribució a més d'estar influenciada per factors genètics i ambientals, probablement també s'expliqui per les diferències en quant a la metodologia utilitzada pel diagnòstic i que és diferent arreu del món. De forma que, la pràctica de determinar sèricament el PSA tan estesa actualment a les regions occidentalitzades, està comportant un major percentatge de biòpsies posteriors realitzades i per tant, un major nombre de casos de CaPr detectats [20]. Existeixen també regions menys desenvolupades que presenten igualment incidències elevades, com són el Carib (79,8), Sud-Àfrica (61,8) i Sud-Amèrica (60,1), mentre que romanen baixes principalment a poblacions asiàtiques, on les proporcions estimades són del 10,5 i 4,5 a l'est i centre-sud d'Àsia, respectivament.

1. 3. 2. Mortalitat

Amb una proporció estimada de 307.000 morts a l'any 2012, el CaPr és la cinquena causa de mort per càncer en homes, representant un 6,6% del total de morts al gènere masculí. Com la determinació del PSA té un efecte molt major en quant a la variabilitat de la incidència arreu del món que en la mortalitat, existeixen menys diferències en els percentatges de mortalitat respecte dels reportats en incidència. Tot i així, hi ha estadístiques

de major mortalitat a determinats països com el Regne Unit, en els quals no està tan estesa la determinació de PSA ni la realització de protocols de 12-18 biòpsies. Per aquests motius és més fàcil que el CaPr es detecti en fases més avançades i que la proporció de morts sigui més alta en certs països.

El nombre de morts causades per CaPr és major en regions poc desenvolupades que en aquelles que ho estan més, representant 165.000 i 142.000, respectivament. Els índexs de mortalitat són generalment més alts en poblacions de raça negra (Carib, 29 per 100.000 i Àfrica Sub-Sahariana, 19-24 per 100.000) i a Escandinàvia, molt baixos a Àsia (2,9 per 100.000 a centre-sud d'Àsia) i intermedis a Amèrica i Oceania.

1. 3. 3. Edat

L'edat dels pacients està estretament relacionada amb la detecció dels casos de CaPr, la majoria dels quals es detecten en homes de més de 60 anys. Únicament, un 1% d'aquests tumors són clínicament diagnosticats en homes menors de 50 anys, fet que contrasta amb l'estudi de Sakr *et al.*, [21] que reporta que un 30% d'homes d'EUA, de 30 a 50 anys, presentaven CaPr detectable a estudis d'autòpsia.

1. 3. 4. Història natural del càncer de pròstata

Existeixen diversos contextos en què es pot diagnosticar el CaPr, que probablement corresponguin a fases diferents d'un mateix procés neoplàsic.

La prevalença del CaPr en autòpsies realitzades per altres causes de mort és força alta, havent-se reportat en un 15-20% d'homes asiàtics i en un 30-40% d'homes occidentals en pròstates processades en la seva totalitat [7]. Tal i com passa al càncer clínicament detectable, als **tumors latents** objectivats a partir de la realització d'autòpsies, la distribució geogràfica és significativament diferent i les diferències ètnico-específiques són igualment presents [22].

La prevalença del **CaPr latent** és extremadament edat-dependent, com el CaPr detectable per clínica. Als EUA, el risc que té un home major de 50 anys de presentar un CaPr latent detectat per autòpsia (42%) és molt més gran que el risc de presentar un CaPr clínicament detectable (9,5%) [23]. En aquest sentit, pren importància la cronologia de la carcinogènesi prostàtica, de la qual actualment encara es continua sense obtenir informació precisa. La idea més consolidada és que el CaPr presenta un creixement molt lent al llarg d'anys, s'acaba

manifestant clínicament i pot acabar progressant cap a estadis avançats i fases més agressives en les qual el creixement és independent del control hormonal androgènic. Alguns estudis realitzats a partir d'autòpsies han permès identificar lesions pre-neoplàsiques prostàtiques des de la quarta dècada de la vida així com ADCs prostàtics clínicament inaparents des de la cinquena dècada [21,24].

Prenent com a referència l'edat a la qual habitualment sol debutar de forma clínica el CaPr, existeixen hipòtesis sobre l'existència d'un període de latència d'una a tres dècades, des de les fases tumorals més primerenques fins a la seva progressió. És per aquest motiu que els carcinomes prostàtics identificats en autòpsies de pacients morts per altres causes, solen denominar-se com a carcinomes "latents".

El **CaPr insignificant** és aquell que presenta un GS combinat igual o menor a 6, absència de patró 4 o 5, volum tumoral mínim ($<0.5 \text{ cm}^3$), i es manté òrgano-confinat a la pròstata, és a dir, en estadis pT2 o inferiors [25]. Es tracta d'una variant força freqüent a l'actualitat, ja que com s'ha comentat prèviament, les determinacions rutinàries del PSA han comportat un sobrediagnòstic d'aquests tumors que, probablement, no haguessin produït manifestacions clíniques pel fet de presentar un comportament indolent [26,27].

Existeixen nombrosos estudis basats en l'anàlisi morfològic i topogràfic de mostres de prostatectomia radical amb CaPr insignificant, que han reportat que aquests casos habitualment són multifocals i, freqüentment, s'identifiquen en pròstates que presenten una marcada hiperplàsia [28]. En aquestes sèries, les xifres sèriques de PSA no s'associen amb les dimensions del tumor però sí amb el pes de la pròstata. Per tant, la hiperplàsia prostàtica seria la responsable de l'elevació sèrica del PSA i, consegüentment, es veuria afavorida la realització de biòpsies en aquests pacients, fet que al seu torn, incrementaria la detecció de focus tumorals de dimensions molt reduïdes [29]. En aquest context, es pensa que el carcinoma prostàtic insignificant o bé, els tumors prostàtics de volum molt reduït reflectirien les fases més inicials de la carcinogènesi prostàtica.

L'anomenat **carcinoma incidental**, una altra variant del CaPr, comprèn aquells tumors ben diferenciats, que acostumen a originar-se predominantment a la zona de transició i són diagnosticats de forma incidental en mostres de resecció transuretral prostàtica. Tendeixen a ser lesions de petites dimensions, que freqüentment coexisteixen amb HBP i presenten com a probables precursors el PIN i la hiperplàsia adenomatosa atípica [30]. Aquest subgrup de

CaPr també és diagnosticat freqüentment en pacients tractats mitjançant procediments quirúrgics com la cistoprostatectomia radical, pel fet de presentar patologia a la bufeta urinària, concretament, carcinomes urotelials múscul-invasius. L'estudi patològic de la pròstata en aquests pacients revela carcinomes incidentals de pròstata amb una freqüència que oscil·la entre 24-51% [31], tot i que en algunes sèries descrites a la literatura pot arribar a ser del 59% [32,33]. Concretament, els CaPr incidentals es detecten en aproximadament un 50% de les prostatectomies radicals realitzades en homes occidentals [33,34], que contrasta amb la prevalença del 10% en homes asiàtics [35,36]. Aquesta variabilitat reportada, a més d'estar condicionada per les diferències ètniques, probablement ho està també pels diferents protocols i abordatges tècnics emprats en l'anàlisi histològic d'aquest tipus de mostres. Fins ara, molts treballs han recalcat el caràcter incidental del diagnòstic del CaPr en aquests pacients, tot i que, estudis emergents suggereixen que un subgrup probablement acabi presentant malaltia clínicament significativa, incrementant-se la prevalença d'aquests diagnòstics amb l'edat [31].

Tot i que es desconeix si pot existir alguna relació entre la carcinogènesi urotelial i la prostàtica, són nombroses les especulacions que s'han fet sobre la possibilitat que aquests casos de CaPr diagnosticats de forma incidental, realment reflecteixen la incidència real dels tumors prostàtics en l'home adult, fet que evidenciaria, a més a més, la seva elevada prevalença. Pel que fa al pronòstic en aquests casos, Bostwick *et al.* [30] van reportar que entre el 8 i el 37% de pacients amb CaPr en estadiatge patològic T1 presentaven risc de progressió tumoral en 10 anys si no rebien tractament.

1. 3. 5. Impacte econòmic

El CaPr constitueix el càncer no cutani més freqüent al sexe masculí i els costos derivats del seu tractament inicial són considerables. Fourcade *et al.* [37] van reportar al 2010 el cost total derivat del tractament durant el primer any de tots els pacients diagnosticats a cinc països europeus. Respectivament, la mitja en milions d'euros va ser de 116,7 al Regne Unit, 244 a Alemanya, 385 a França, 202 a Itàlia i 114,6 a Espanya. Aquest estudi pretenia fer reflexionar sobre el cost significatiu de la malaltia i que, donat la seva alta i creixent prevalença, els programes nacionals de salut haurien de destinar fons a garantir mesures prioritàries pel seu diagnòstic i tractament. Roehrborn *et al.* [38] van publicar les dades disponibles referents al cost mig per pacient derivat del tractament inicial en cinc països europeus, incloent el cost de la biòpsia i del subseqüent tractament quirúrgic o no quirúrgic.

La mitja va ser, respectivament, de 3.171 € al Regre Unit, 4.057 € a Alemanya, 5.851 € a França, 5.226 € a Itàlia i 3.256 € a Espanya (Figura 4). Als EUA, al 2006 el cost total invertit en CaPr va ser de 9.862 bilions de dòlars (\$), sent la mitja anual per pacient de 10.612 \$ a la fase inicial post-diagnòstic, de 2.134 \$ per cures continuades i de 33.691 \$ a l'últim any de vida [38].

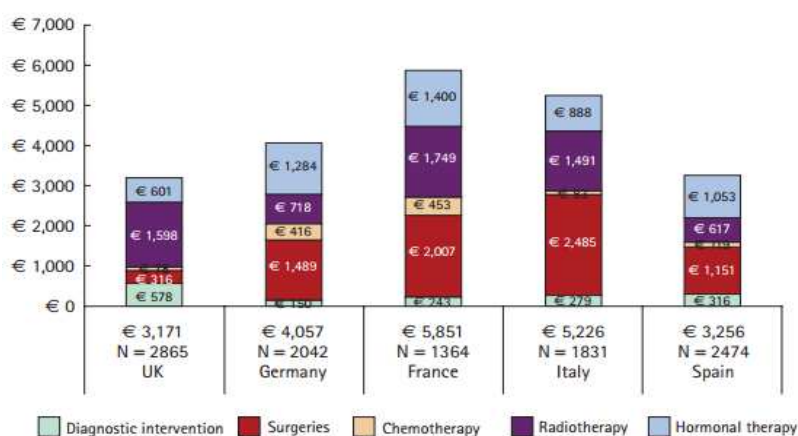


Figura 4: Distribució dels costos totals relatius a tractament inicial (diagnòstic, cirurgia, quimioteràpia, radioteràpia i hormonoteràpia) per pacient al Regne Unit, Alemanya, França, Itàlia i

1. 4. Característiques clínico-patològiques del càncer de pròstata

1. 4. 1. Classificació segons grups pronòstics: OMS 2016

El sistema de gradació del CaPr més usat i estès mundialment va ser desenvolupat entre els anys 1966-1974 pel Dr. Donald Gleason [39]. Aquest sistema es basa únicament en el patró arquitectural del tumor, definint-se el GS com la suma dels dos patrons arquitecturals més freqüents [17]. Tal i com s'ha explicat prèviament, a aquests dos patrons se'ls assigna un número del 1 (millor grau de diferenciació) al 5 (pitjor grau de diferenciació). D'aquesta manera s'obtenen GS que varien des de 2 (1+1) fins a 10 (5+5).

El sistema de gradació de Gleason ha anat evolucionant al llarg dels anys [40,41], i actualment difereix de l'original de forma significativa. Per exemple, els GS 2-5 ja no acostumen a assignar-se en biòpsies d'agulla, entre d'altres raons per la baixa reproductibilitat entre patòlegs i la pobre correlació amb el GS observat en la peça de prostatectomia radical. El patró de Gleason 3 es correspon amb la presència de glàndules individuals, ben formades, discretament unides i de mides relativament variables. La presència de glàndules fusionades o pobrament formades, així com la presència de glàndules cribiformes i glomeruloides ja correspon a un patró de Gleason 4. El patró de Gleason 5

consisteix en observar cèl·lules tumorals individuals, en cordons o bé, formant nusos sòlids. La presència de comedonecrosi, definida com la presència de cèl·lules necròtiques intraluminals, també es grada com a patró de Gleason 5.

Al llarg dels anys, s'han detectat algunes deficiències en el sistema original de Gleason que han causat un impacte en el tractament rebut pels pacients. Per exemple, el fet d'assignar com a grau més baix el GS 6 en una escala de 2 a 10 ha comportat que els pacients assumeixin que tenen un CaPr que se situa al mig de l'escala de gradació, enlloc d'un que té bon pronòstic. Una altra deficiència ha sigut que durant molt de temps per als tumors amb un GS 7, les decisions terapèutiques s'han basat en aquest sumatori simplificat, sense desglossar si deriva d'un 3 + 4 o d'un 4 + 3. Per tal de resoldre aquests problemes, recentment s'ha desenvolupat un sistema basat en els **“Grups de Grau” (GG) (Figura 5)**. Primerament, aquests grups es van introduir en un estudi publicat [42], i després es van verificar en una meta-anàlisi amb més de 20.000 homes amb CaPr tractats amb prostatectomia radical en cinc institucions diferents [41]. Cadascun dels GG s'associa amb un pronòstic determinat.

Grade group 1 (Gleason score 3 + 3 = 6): Only individual discrete well-formed glands
Grade group 2 (Gleason score 3 + 4 = 7): Predominantly well-formed glands with lesser component of poorly formed/fused/cribriform glands
Grade group 3 (Gleason score 4 + 3 = 7): Predominantly poorly formed/fused/cribriform glands with lesser component of well-formed glands †
Grade group 4 (Gleason score 8)
- Only poorly formed/fused/cribriform glands or
- Predominantly well-formed glands and lesser component lacking glands ††
- Predominantly lacking glands and lesser component of well-formed glands ††
Grade group 5 (Gleason scores 9–10): Lack of gland formation (or with necrosis) with or without poorly formed/fused/cribriform glands †
† For cases with >95% poorly formed/fused/cribriform glands or lack of glands on a core or at radical prostatectomy, the component of <5% well-formed glands is not factored into the grade.
†† Poorly formed/fused/cribriform glands can be a more minor component.

Figura 5: Classificació histològica d'Epstein *et al.* per a definir el sistema complementari de gradació del CaPr basat en els GG [41].

Respecte als sistemes previs, aquest nou mètode contribueix a estratificar de forma més acurada els graus histològics, simplificar les categories diagnòstiques en cinc GG, i a implementar una escala més intuïtiva, que comença des del número 1 enlloc des del 6. La recomanació actual és reportar els GG conjuntament amb els GS modificats per la OMS al 2016.

1. 4. 2. Sistema d'estadiatge patològic: classificació TNM (AJCC 8th Edition, 2017)

El sistema d'estadiatge TNM és el mètode clínic considerat com a *gold-standard* per tal de guiar les decisions terapèutiques i està basat en la localització del tumor primari (malaltia òrgano-confinada o no) (**pT**), l'afectació dels ganglis limfàtics regionals (**pN**) i la presència de metàstasis a distància (**pM**) (**Figures 6a-d**). La categoria pT s'assigna en peces de prostatectomia radical, un cop analitzades de forma exhaustiva.

En edicions anteriors de la classificació patològica de l'AJCC, els tumors prostàtics òrgano-confinats (pT2) se subdividien en pT2a, pT2b i pT2c en funció de la lateralitat del tumor, per tal de mantenir la simetria amb les subcategories de l'estadiatge clínic. Tanmateix, degut a la manca de rellevància a nivell clínic, la classificació actual de l'AJCC 8th Edition del 2017 no inclou aquesta subclassificació, de forma que els tumors pT2 són aquells confinats a la pròstata i els pT3 aquells que s'estenen més enllà de la càpsula prostàtica. En canvi, la categoria pT3 manté la seva subdivisió en pT3a i pT3b, segons si s'evidencia invasió extracapsular en qualsevol localització, o bé si hi ha invasió de les vesícules seminals amb o sense invasió extracapsular, respectivament [43].

Categoria T	Criteri T
TX	Tumor primari no pot ser valorat
T0	Sense evidència de tumor primari
T1	Tumor clínicament inaparent, no palpable
T1a	Troballa histològica tumoral incidental ($\leq 5\%$ de tumor del total de teixit ressecat)
T1b	Troballa histològica tumoral incidental ($> 5\%$ de tumor del total de teixit ressecat)
T1c	Tumor identificat per biòpsia d'agulla en un o ambdós lòbuls prostàtics, però no palpable
T2	Tumor palpable i confinat a la pròstata
T2a	Tumor infiltra $\leq 50\%$ d'un lòbul
T2b	Tumor infiltra $> 50\%$ d'un lòbul
T2c	Tumor infiltra els dos lòbuls prostàtics

T3	Extensió tumoral extraprostàtica, sense envair estructures adjacents
T3a	Extensió extraprostàtica (uni o bilateral)
T3b	Tumor envaeix vesícula (es) seminal (s)
T4	Tumor infiltra estructures adjacents diferents a les vesícules seminals (esfínter extern, recte, bufeta urinària, músculs elevadors o paret pèlvica)

Figura 6a: Definició de tumor primari (T) de la classificació clínica d'estadiatge del CaPr (AJCC 8th Edition, 2017). [43]

És important distingir entre l'estadiatge clínic i el patològic, ja que aquest últim és el que es realitza a partir de l'anàlisi microscòpic de la peça de prostatectomia radical. En canvi, l'estadificació clínica comença un cop el diagnòstic patològic de CaPr s'ha establert. Les variables clíniques més freqüentment utilitzades per assignar l'estadiatge clínic són el tacte rectal, el PSA total sèric, les imatges radiològiques, el GS i la limfadenectomia quirúrgica [43].

Categoria T	Criteri T
T2	Tumor confinat a la pròstata
T3	Extensió tumoral extraprostàtica
T3a	Extensió extraprostàtica (uni o bilateral) o invasió microscòpica del coll vesical
T3b	Tumor envaeix vesícula (es) seminal (s)
T4	Tumor infiltra estructures adjacents diferents a les vesícules seminals (esfínter extern, recte, bufeta urinària, músculs elevadors o paret pèlvica)

Figura 6b: Definició de tumor primari (T) de la classificació patològica d'estadiatge del CaPr (AJCC 8th Edition, 2017). A destacar que no hi ha categoria patològica T1. [43]

Categoria N	Criteri N
NX	Ganglis limfàtics regionals no valorats
N0	No ganglis limfàtics regionals infiltrats per tumor
N1	Metàstasis en gangli (s) limfàtic (s) regional (s)

Figura 6c: Definició de l'afectació dels ganglis limfàtics regionals (N) de la classificació patològica d'estadiatge del CaPr (AJCC 8th Edition, 2017). [43]

Categoria M	Criteri M
M0	No metàstasis a distància
M1	Metàstasis a distància
M1a	Gangli (s) limfàtic (s) no regional (s)
M1b	Os
M1c	Altres localitzacions amb o sense malaltia òssia

Figura 6d: Definició de metàstasis a distància (M) de la classificació patològica d'estadiatge del CaPr (AJCC 8th Edition, 2017). [43]

1. 5. Diagnòstic del càncer de pròstata

1. 5. 1. Tacte rectal

El **tacte rectal (TR)** no és una tècnica extraordinàriament sensible ni específica per detectar el CaPr, existint un 25-50% de tumors detectables per PSA que no ho són per TR, especialment tumors de localització anterior o lateral [44]. A més cal destacar que hi ha altres entitats com la HBP o la prostatitis, que poden comportar tacles rectals anòmals. Els carcinomes de pròstata detectables per TR acostumen a ser de majors dimensions, presentar estadis més avançats i tenir extensió extra-prostàtica microscòpica en comparació amb aquells que són detectables per PSA [45].

1. 5. 2. PSA

El PSA és una serina proteasa de la família de les cal·licreïnes produïda per l'epiteli prostàtic i segregada al semen, la funció de la qual és dissoldre el coàgul seminal que es forma després de l'ejaculació. L'alliberament del PSA al torrent sanguini permet la seva detecció a sèrum, on està principalment unit a proteïnes plasmàtiques, tot i que també comprèn una fracció lliure minoritària. El percentatge de PSA lliure (fPSA), és a dir, la relació entre el PSA lliure i el PSA total, acostuma a ser menor en homes amb CaPr en comparació amb aquells amb HBP o infeccions. Concretament, valors de fPSA <20% estan associats amb una major probabilitat de detecció de CaPr [46].

La determinació sèrica de PSA constitueix una de les proves més importants utilitzades tant pel cribratge de CaPr com pel seu diagnòstic, tractament i pronòstic, ja que els nivells a sèrum correlacionen de forma significativa amb el risc de tenir CaPr. Habitualment, la majoria de laboratoris consideren que un PSA sèric de 4 ng/ml és el valor llindar (*cut-off*) entre els resultats considerats com a normals i els patològics [47].

Una de les limitacions més importants del PSA com a marcador és que es tracta d'una substància específica de la glàndula prostàtica, però no del CaPr, i les seves concentracions també poden augmentar a la HBP, en casos de prostatitis i/o de manipulació de la pròstata, entre d'altres situacions. Aquest fet, juntament amb la variabilitat biològica de les concentracions de PSA en un mateix individu, limita el seu ús com a única tècnica emprada, condicionant una baixa especificitat i un baix valor predictiu positiu. Contràriament, pacients amb CaPr òrgano-confinat poden tenir valors de PSA ≤ 4 ng/ml. Per aquests motius s'han proposat diverses mesures per tal de millorar la seva sensibilitat i especificitat, com per exemple, aplicar una correcció al PSA segons les dimensions de la pròstata per tal d'identificar l'augment de concentració de la proteïna associada a un increment de la mida glandular. Altres procediments que es podrien utilitzar serien una escala mòbil que considerés l'augment de PSA que es produeix amb l'edat o bé, observar les variacions en les seves concentracions i les diferents medicions realitzades al llarg del temps. En aquest sentit, un increment ràpid del PSA, malgrat estigui dintre de l'interval considerat com a "normal", hauria de motivar l'estudi diagnòstic.

L'ús del PSA com a eina de cribratge en CaPr està àmpliament difós i ha comportat un important augment en la detecció d'aquests càncers, diagnosticant-se així tumors que

probablement no s'haguessin presentat clínicament [26,27]. Tot i així, les recomanacions respecte el cribratge del CaPr i l'ús del PSA generen controvèrsia [48]. En homes amb una esperança de vida major a 10 anys, una sistemàtica raonable seria fer partícip al pacient i traslladar-li els pros i els contres del que pot comportar el cribratge per tal d'implicar-lo en el procés de presa de decisions [49]. Igualment, en aquells casos en què ja s'ha fet el diagnòstic de càncer, les determinacions seriades del PSA resulten valuoses per tal d'avaluar la resposta al tractament, així com per identificar aquells pacients tractats amb prostatectomia radical o radioteràpia que presenten malaltia bioquímica recurrent.

1. 5. 3. Diagnòstic per imatge

L'ecografia transrectal de la pròstata és la tècnica d'elecció per confirmar la presència de CaPr en aquells pacients amb una sospita clínica consistent basada en un TR patològic i /o nivells elevats de PSA sèrics. Tanmateix, presenta certes limitacions per calcular el volum tumoral i l'extensió extra-prostàtica [50]. Tot i així, la realització de biòpsies sistemàtiques guiades per ecografia ha millorat significativament la proporció de diagnòstics de CaPr.

La **ressonància magnètica** (MRI) és una prova d'imatge no invasiva de gran utilitat per localitzar els tumors prostàtics i determinar les seves dimensions i nivell d'infiltració [51]. Les biòpsies guiades per MRI són menys invasives i constitueixen una eina diagnòstica eficaç en aquells pacients amb sospita clínica de CaPr amb biòpsies negatives prèviament efectuades mitjançant ecografia prostàtica [52]. Degut al bon contrast a parts toves i la resolució que pot arribar a assolir la prova, la MRI també resulta d'utilitat per avaluar pacients amb CaPr amb un elevat risc d'afectació òssia [53].

1. 5. 4. Biòpsia prostàtica

Els nivells de PSA juntament amb el TR i altres factors com l'edat dels pacients, l'ètnia o la història familiar s'utilitzen per determinar la necessitat o no de realitzar una biòpsia prostàtica.

El procediment més usual és el de la **biòpsia d'agulla** (*needle core biopsy*) guiada per ecografia transrectal, mitjançant el qual s'obtenen de forma sistemàtica un mínim de 10-12 cilindres de pròstata i d'altres addicionals en funció de si existeix una localització sospitosa detectada per TR i/o proves d'imatge. Freqüentment, les biòpsies s'obtenen per abordatge transrectal, malgrat que la via transperineal pot proporcionar els mateixos resultats. Les

biòpsies per saturació (>20 *cores*) s'obtenen mitjançant un model (*template guided biopsy*) en aquells casos amb una elevada sospita de CaPr i biòpsies prèvies negatives. Els cilindres de pròstata obtinguts s'envien al departament de patologia en recipients separats per tal de ser processats i reportats de forma individual. Preferentment, s'aconsella entre 1-2 cilindres per cassette (màxim de 3), respectivament pintats per tal de poder diferenciar-los [54]. Per tal d'incrementar el llindar del diagnòstic de CaPr, és recomanable també realitzar seccions histològiques a diferents nivells amb un gruix màxim de 4 µm.

Actualment, degut a les diverses conductes terapèutiques utilitzades en la HBP, s'ha experimentat un augment en la incidència de CaPr detectats en mostres de **resecció transuretral prostàtica (RTUp)**. Les mostres obtingudes per aquesta tècnica que presenten un pes ≤ 12 g s'han de processar de forma íntegra, típicament en 6-8 cassettes, fet que garanteix la identificació de pràcticament tots els tumors cT1b i aproximadament un 90% dels que presenten un estadiatge cT1a [55-57]. En aquelles mostres que pesin > 12 g, a més de les càpsules recomanades, s'aconsella un cassette per cada 5 g addicionals de teixit. En cas de diagnosticar un carcinoma incidental afectant < del 5% del teixit remès, s'aconsella realitzar inclusió total, especialment si es tracta d'individus joves [55].

La **prostatectomia radical (PR)** és una de les tècniques més utilitzades en el tractament del CaPr òrgano-confinat. Es recomana pesar la glàndula prostàtica abans i després de la separació de les vesícules seminals i obtenir les tres dimensions, respectivament, la vertical (de basal a apical), la transversal, i la sagital (d'anterior a posterior). Així mateix, la superfície de la pròstata ha de ser pintada per tal de poder valorar correctament l'estat dels marges de resecció quirúrgics, recomanant-se també l'ús de dos colors diferents per tal de caracteritzar la lateralitat del tumor. Abans de realitzar seccions macroscòpiques, la glàndula ha d'estar correctament fixada amb formalina al 10% com a mínim durant 24 hores [7]. És especialment rellevant de cara a l'estadiatge incloure la porció més basal de les vesícules seminals i la seva unió amb la base. Sempre i quan l'examen microscòpic no es vegi compromès, es pot obtenir teixit tumoral en fresc per activitats de recerca (biobanc, assaigs clínics) i és aconsellable realitzar-ho tan bon punt acaba la cirurgia i la mostra és remesa al departament de patologia.

La introducció de proves de detecció com la determinació del PSA en sèrum, o l'obtenció de biòpsies d'agulla ja sigui per sextants o bé, usant protocols més ampliat, de 8 a 12

cilindres, ha permès incrementar el nombre de casos diagnosticats de càncer prostàtic. A més a més, aquests tumors s'aconsegueixen identificar en estadis més primerencs i en pacients més joves i, conseqüentment, s'ha observat també un increment relatiu de la supervivència per aquest tipus de càncer [58].

1. 5. 4. 1. Immunohistoquímica

L'estudi immunohistoquímic és una eina diagnòstica de gran utilitat en determinats casos, havent-se d'interpretar els resultats en el context histopatològic i clínic-radiològic pertinent. Els marcadors immunohistoquímics més utilitzats per confirmar la presència d'ADCs són els anticossos anti-cèl·lules basals [59], ja que aquestes cèl·lules estan absents al càncer, tret de rares excepcions. Els principals anticossos per confirmar la seva presència són les citoqueratines d'alt pes molecular (**34βE12 o CK903**) i la proteïna **p63**. És important destacar que la pèrdua de cèl·lules basals no és específica de carcinoma i també es pot observar en entitats benignes pseudo-neoplàsiques, com l'adenosi o l'atròfia parcial [60].

L'anticòs **AMACR (P504S o racemasa)** també s'utilitza perquè, aproximadament, el 80-100% dels ADCs acinars són AMACR-positius. És recomana utilitzar-lo conjuntament amb marcadors anti-cèl·lules basals perquè pot caracteritzar tant l'epiteli prostàtic neoplàsic com el pre-neoplàsic d'alt grau.

L'expressió de la proteïna **ERG** és altament específica d'epiteli prostàtic neoplàsic però presenta una sensibilitat del 50% i es caracteritza també per ser significativament heterogènia, probablement pel desenvolupament de diferents subclones durant la progressió tumoral [61].

Existeix una situació on la immunohistoquímica té un paper rellevant, com és el diagnòstic diferencial entre l'ADC prostàtic pobrament diferenciat i el carcinoma urotelial (UC). Els millors marcadors en aquest escenari són **PSA i GATA3** [59,62]. GATA3 és un factor de transcripció que modera la diferenciació cel·lular urotelial, s'expressa en un 80% dels UCs, i és negatiu en pràcticament la majoria d'ADCs prostàtics. En canvi, PSA és positiu al 90-95% dels ADCs prostàtics d'alt grau i negatiu als UCs.

1. 6. Tractament del càncer de pròstata

1. 6. 1. Tractament quirúrgic - Prostatectomia radical

Es tracta d'un dels procediments més utilitzats pel tractament del CaPr localitzat, podent-se realitzar per cirurgia oberta, laparoscòpica o robòtica. Un maneig apropiat així com una anàlisi exhaustiva de la mostra obtinguda és fonamental per caracteritzar el tumor en quant a grau, volum, estadiatge patològic, estat dels marges de resecció quirúrgica, totes elles variables que guien el maneig del pacient i marquen el pronòstic [56]. Concretament, el GS juntament amb l'estadiatge clínic i la determinació sèrica de PSA constitueixen importants factors predictius de l'evolució post-radioteràpia.

A l'actualitat, malgrat que l'increment relatiu de la supervivència per CaPr degut a la seva detecció precoç es tracta d'una tendència positiva, s'han generat certes controvèrsies en relació a la necessitat de realitzar o no PR i/o altres tractaments radicals, especialment en pacients joves i amb tumors de poc volum, ja que aquests procediments no estan exempts de morbiditat i tenen un cost econòmic important.

1. 6. 2. Tractament adjuvant del càncer de pròstata - Radioteràpia (RT)

S'utilitzen dues formes de RT per tractar el CaPr: la RT externa i la braquiteràpia o RT d'implantació intersticial. Aquesta última consisteix en administrar una font radioactiva (iode-123 (I-123), or-198 (Au-198), pal·ladi i iridi) dins la pròstata i guiada per ecografia. La seva indicació queda restringida a tumors petits en estadi T1 o T2, amb resultats semblants als de la cirurgia.

En línies generals, en tumors localitzats de baix grau, els resultats obtinguts amb cirurgia i amb RT externa són equivalents, amb taxes de control de malaltia a 5 anys del 80%.

1. 6. 3. Hormonoteràpia i quimioteràpia

El CaPr està constituït per una població heterogènia de cèl·lules androgen-dependents i androgen-independents. La supressió hormonal o deprivació androgènica consisteix en aplicar tractaments que aconseguen disminuir al màxim els nivells de testosterona a l'organisme, frenant el creixement de les primeres cèl·lules, però no de les segones. Amb aquest teràpia de deprivació hormonal s'ha observat que disminueixen tant les dimensions de la glàndula prostàtica normal com les del tumor.

Es pot aconseguir la disminució dels nivells d'andrògens circulants mitjançant diferents mètodes com, per exemple, la **castració quirúrgica (orquiectomia)**, que té un ràpid efecte supressor hormonal i està indicada en les compressions medul·lars per metàstasis. Els **antiandrògens** (bicalutamida, flutamida, acetat de ciproterona) que competeixen amb el receptor androgènic i solen utilitzar-se conjuntament amb **agonistes de la LHRH** (goserelina, leuprorelina, triptorelina, buserelina), també suprimeixen la secreció de LH i d'andrògens.

La **quimioteràpia** (docetaxel, cabazitaxel, mitoxantrona) ja es va mostrar efectiva als anys 90 com a tractament pal·liatiu del CaPr, i habitualment s'utilitza quan la teràpia hormonal ja no és útil perquè el tumor és transforma en resistent al tractament hormonal. Fins a l'actualitat, la combinació docetaxel-prednisona ha estat considerada com a tractament estàndard del CaPr resistent a la castració. La quimioteràpia amb docetaxel es recomana en pacients amb CaPr metastàtic associada al tractament inicial amb anàlegs LHRH, especialment en pacients amb un gran volum tumoral i sobretot, amb malaltia metastàsica d'inici [63]. D'altra banda, el cabazitaxel va ser el primer fàrmac aprovat al nostre país per a la indicació de CaPr resistent a castració i que ha progressat a quimioteràpia amb docetaxel. Com a alternativa terapèutica en casos de CaPr metastàsics resistents a castració en pacients que han progressat al tractament amb docetaxel, també s'han comercialitzat recentment al nostre país nous fàrmacs hormonaals, com l'enzalutamida i l'abiraterona en combinació amb prednisona.

1. 6. 4. Tractament segons estadiatge

Per als tumors amb estadiatges T1 i T2, no existeix fins al moment cap estudi comparatiu directe entre les tres opcions de tractament. En general, en pacients joves es recomana cirurgia i en pacients de més edat la recomanació és l'observació o bé, la radioteràpia [63]. Per als estadiatges T3 i T4 les opcions de tractament recomanades són la RT externa amb o sense braquiteràpia, la RTUp, la PR o bé, la teràpia hormonal basada en la supressió androgènica, usualment en combinació amb la cirurgia i la RT [63].

1. 6. 5. Recidiva bioquímica

Després de la realització de la PR, els pacients són monitoritzats amb determinacions de PSA. Quan les xifres de PSA post-PR són superiors a 0,4 ng/ml es considera recidiva bioquímica i es sospita de l'existència de possibles metàstasis locoregionals o a distància.

Després de la realització de RT com a tractament del CaPr localitzat, el descens dels nivells de PSA és paulatí (a diferència de la PR) fins a aconseguir un **valor nadir**, que és el valor mínim assolit post-tractament i que s'utilitza com a referència per al posterior seguiment. Existeixen diversos criteris per tal de diagnosticar una recidiva bioquímica post-tractament amb RT: quan es constata la presència de tres elevacions successives a partir del valor nadir (definició ASTRO), i quan s'evidencia un augment de com a mínim 2 ng/ml per sobre del valor nadir (valor nadir+2) (definició Houston), entre d'altres [64].

1. 7. Pronòstic i factors predictius del càncer de pròstata

El fet de reportar **factors pronòstics del CaPr en biòpsies d'agulla** és d'utilitat alhora de predir les troballes histològiques definitives a la PR i estimar el risc de progressió de la malaltia amb o sense tractament amb intenció curativa. El College of American Pathologists (CAP) recomana reportar els següents trets patològics: tipus histològic, nombre de cilindres afectats per tumor, nombre total de cilindres obtinguts, extensió lineal tumoral i/o proporció de teixit prostàtic afectat per tumor, GS, GG, presència d'extensió extraprostàtica, i invasió de les vesícules seminals [54]. D'aquests, el factor predictiu i pronòstic més important és el GS, ja que s'utilitza per predir l'estadiatge post-operatori, la progressió tumoral i la mortalitat associada [7]. Igualment, el GS té un paper decisiu en quant al tractament. Actualment, la majoria de protocols de vigilància activa (VA) exclouen els pacients amb un GS > 6 [65]. La VA és una estratègia emergent de maneig clínic en la qual els pacients diagnosticats de CaPr són controlats de forma regular mitjançant determinacions sèriques de PSA, TR i repetició de biòpsies 6-12 mesos després del diagnòstic inicial i després anualment durant 10 anys, enlloc de rebre un tractament immediat i definitiu. L'aplicabilitat d'aquest mètode es basa en una bona selecció de pacients amb baix o molt baix risc [66], els criteris d'inclusió del qual són: edat, nivells sèrics de PSA, GS, nombre de cilindres afectats per tumor i proporció de teixit tumoral afectant els diferents *cores* [65]. Tanmateix, un estudi recent evidencia que els pacients amb CaPr localitzat i clínicament detectat i amb una esperança de vida llarga van beneficiar-se del tractament quirúrgic (PR), amb un guany mig de 2,9 anys de vida [67].

Els pacients amb ADC prostàtic amb diferenciació ductal o sarcomatoide, carcinoma neuroendocrí de cèl·lula petita, o carcinoma intraductal no són candidats a sotmetre's a VA

ja que aquestes variants histològiques s'associen a pitjor pronòstic. En aquest sentit, un factor limitant d'èxit de la VA és la presència d'un carcinoma d'alt grau no biopsiat [65].

L'estratificació del risc en diferents categories ha facilitat el maneig clínic així com la implementació de les estratègies terapèutiques a aplicar. A continuació es mostra un exemple d'estratificació del risc del National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®), que incorpora factors clínics i patològics [68] (Figura 7).

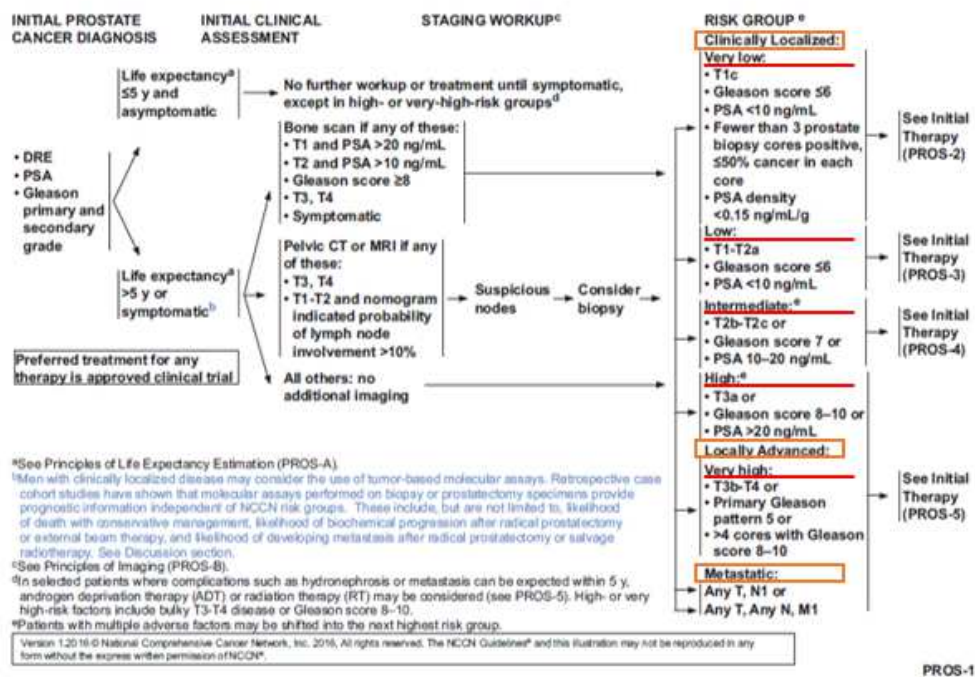


Figura 7: Estratificació del CaPr en grups de risc de la NCCN® (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology for prostate cancer, V.1.2016) [68].

Un cop analitzada la **peça de PR**, l'altre factor pronòstic important de cara a predir la probabilitat de recurrència i mortalitat associada és l'estadiatge patològic (veure apartat 1.4.2. Sistema d'estadiatge patològic: classificació TNM (AJCC 8th Edition, 2017)). L'extensió extraprostàtica del CaPr és un factor predictor independent de recurrència bioquímica post-PR [69-71]. La invasió de les vesícules seminals (IVS) també és un factor pronòstic advers determinant de supervivència lliure de malaltia post-PR. L'estat dels marges quirúrgics i l'extensió afectada per tumor en el cas d'un marge quirúrgic positiu també són factors predictors de recurrència bioquímica post-PR [72], motiu pel qual la ISUP recomana reportar la longitud (en mm) de tumor afectant el marge [56]. La presència

d'invasió perineural no mostra associació amb el pronòstic dels pacients [73], a diferència de la invasió angio-limfàtica, que es pot arribar a identificar en un 5-53% de les PR.

Finalment, els biomarcadors d'utilitat clínica poden proporcionar informació més precisa que la que ofereix la morfologia mitjançant la tinció d'Hematoxilina-Eosina. Actualment, l'aparició de nous biomarcadors predictius d'agressivitat tumoral és necessària ja que serà de gran ajuda alhora de determinar el pronòstic, el tractament i el maneig clínic dels pacients.

1. 8. Característiques moleculars del càncer de pròstata i carcinogènesi prostàtica

El CaPr és una malaltia multifocal i són molts els estudis en els quals s'han analitzat molecularment diferents focus tumorals dins d'una mateixa glàndula, que constaten que els orígens d'aquests focus són independents [74,75]. Concretament, a nivell morfològic i/o genòmic, tant l'heterogeneïtat tumoral com la variabilitat intra o interindividual característica d'aquestes neoplàsies, venen definides fonamentalment per alteracions cromosòmiques estructurals i/o numèriques més que per mutacions puntuals pròpiament.

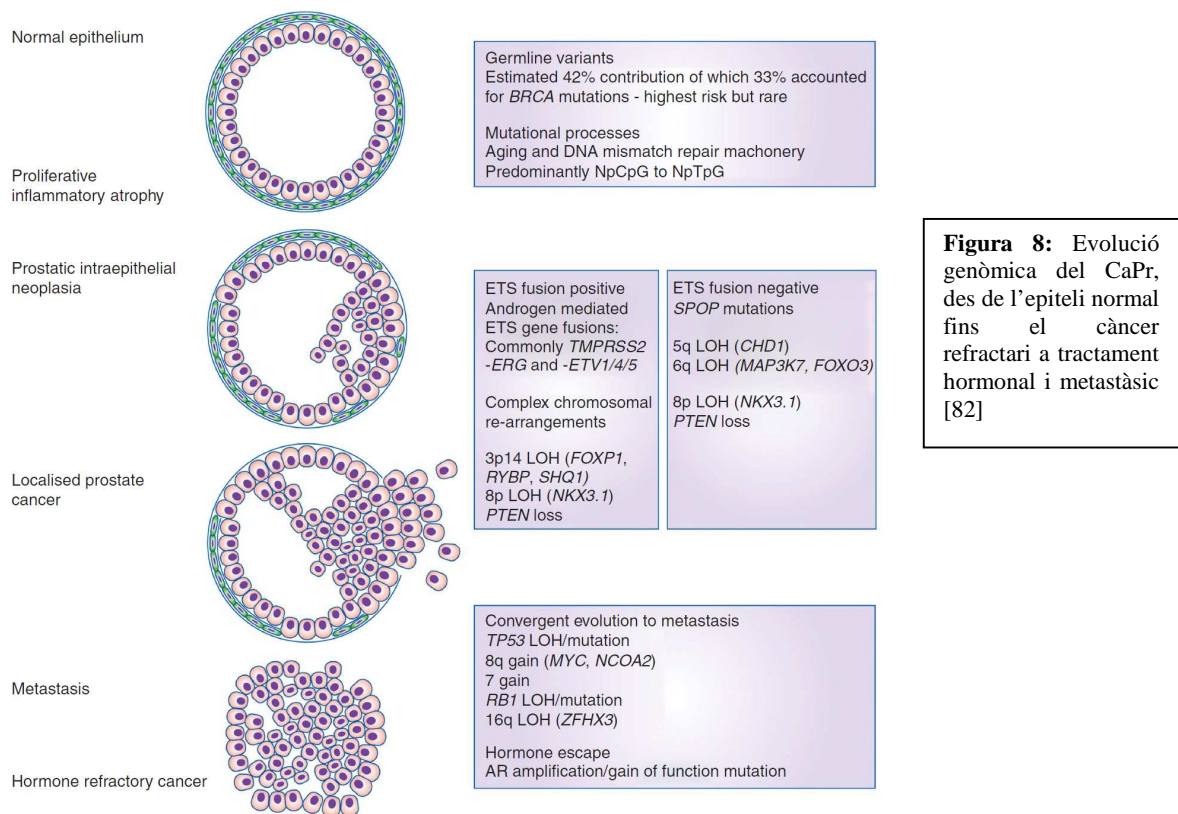
Estudis genètics recents en CaPr han revelat nombroses alteracions a l'ADN que impliquen desregulació gènica en processos com el desenvolupament del teixit prostàtic, modificació cromatínica, regulació del cicle cel·lular i senyalització androgènica, entre d'altres [76]. Berger *et al.* van publicar un estudi l'any 2011 que representava la primera anàlisi de seqüenciació genòmica (*Whole genome sequencing*) de CaPr en éssers humans. L'elevada prevalença d'alguns gens de fusió presents de forma recurrent en aquests tumors va ressaltar la importància dels reordenaments cromosòmics com a esdeveniments cabdals en l'inici de la carcinogènesi prostàtica [77].

Al 2013 Baca *et al.* van seqüenciar el genoma de 57 tumors prostàtics identificant abundants translocacions i delecions a l'ADN originades de forma independent. Van descriure aquest fenomen com a "cromoplexia" (del grec *pleko*, que significa entrellaçar o trenar), fent referència al procés de reestructuració genòmica pel qual múltiples regions genòmiques geogràficament distants es trenquen simultàniament. La cromoplexia sembla tenir un paper important en la tumorigènesi del CaPr, mitjançant el trencament de gens supressors tumorals i la creació de gens de fusió amb potencial oncogènic [78]. Gens que de forma recurrent presentarien alteracions estructurals per cromoplexia serien *PTEN*, *NKX3.1*, *CDKN1B*, *TP53*

i *RB*, entre d'altres [78]. De forma consensuada, es va acceptar que l'evolució tumoral començaria amb events com la pèrdua de *NKX3.1* o la fusió de *TMPRSS2* i *ERG* i prosseguiria amb la pèrdua de *CDKN1B*, *TP53* i *PTEN*. El grau histològic tumoral podria ser un reflex de la seva progressió al llarg d'aquesta via molecular.

Respecte a les metàstasis, treballs més recents aporten dades que suggereixen que aquestes s'originarien molt probablement d'un únic focus tumoral [79-81]. D'aquesta forma, sembla que l'heterogeneïtat d'una neoplàsia s'incrementaria a mesura que diferents alteracions genètiques co-existents permeten que les clones competeixin entre elles dins del micro-ambient tumoral. I així, aquesta heterogeneïtat només semblaria atenuar-se quan la clona tumoral amb més capacitat adaptativa emergeix, conferint potencial metastàtic locorregional i/o a distància.

Amb la recent implementació de noves tècniques moleculars de seqüenciació massiva i la seva utilització creixent s'estan podent definir subgrups de CaPr, tot i que encara no es disposa d'una classificació molecular exhaustiva que permeti elaborar guies estratègiques respecte el tractament i pronòstic en aquests pacients [81-85]. En aquest sentit, existeixen a la literatura científica treballs d'investigació que han caracteritzat múltiples gens implicats en CaPr, tant esporàdic com familiar, descrivint el seu possible rol en les diverses etapes de la carcinogènesi prostàtica [81,83,86-89] (**Figura 8**).



1. 8. 1. Gens de fusió: tumors “ETS-positius”

L'existència de reordenaments genètics entre el gen regulat per andrògens Transmembrane Protease Serine 2 (*TMPRSS2*) i alguns factors de transcripció oncogènics pertanyents a la família E twenty-six (ETS), va ser descrita per primera vegada per Tomlins *et al* [90].

Concretament, van caracteritzar el reordenament cromosòmic entre *TMPRSS2* i *ERG*, membre de la família ETS, que dona lloc al gen de fusió conegut com a *TMPRSS2-ERG*, present en aproximadament un 50% dels casos de CaPr, i que actualment defineix el major subgrup molecular en aquestes neoplàsies [91].

TMPRSS2 (21q22.3) i *ERG* (21q22.2) es localitzen al cromosoma 21 a 2,9 megabases de distància [92]. La fusió entre aquests dos gens es pot produir tant per translocació com per deleció de la regió cromosòmica que els separa, amb una freqüència de 55 i 45%, respectivament per cadascun dels mecanismes [93]. Tot i que s'han reportat més de 20 isoformes de *TMPRSS2-ERG* [93], la més habitual és aquella que implica a l'exó 1 de *TMPRSS2* i a l'exó 4 d'*ERG*. La presència d'algunes d'aquestes isoformes, concretament

aquelles en les quals es veuen implicades els exons 1-2 de *TMPRSS2* i l'exó 4 d'*ERG*, van ser descrites per Wang *et al.*, associades amb trets tumorals més agressius [94].

Meiers *et al.* han reportat multifocalitat del CaPr amb una freqüència que varia entre un 67% i un 87% en peces de PR analitzades [95]. En aquest context de **multifocalitat tumoral**, diferents grups han analitzat les fusions dels gens *ETS*, demostrant que entre un 32,5% i un 67% de casos alberguen focus tumorals que difereixen entre ells respecte la presència de fusions *ETS* o bé, respecte el mecanisme de fusió pel qual aquestes s'han produït, recolzant així el concepte de multiclonalitat tumoral [61,96,97].

Inicialment, la presència de *TMPRSS2-ERG* va ser identificada tant en càncers òrgano-confinats com metastàsics i refractaris a tractament hormonal. Tanmateix, al 2006 Cerveira *et al.* van descriure per primera vegada la presència de *TMPRSS2-ERG* en un 21% de casos corresponents a lesions de PIN, en comparació amb un 50% dels CaPr òrgano-confinats [98], suggerint d'aquesta manera la seva implicació com a event inicial en la carcinogènesi prostàtica [3,90,99]. Així, les lesions de HGPIN i el CaPr semblen compartir perfils transcripcionals molt semblants [100].

Més tard, Furusato *et al.* [96] van demostrar també la presència d'aquest gen de fusió en **l'epiteli prostàtic benigne**, estudi en què es relaciona aquesta troballa amb la probable aparició de carcinoma en fases posteriors. Aquests autors suggereixen que la detecció de *TMPRSS2-ERG* en glàndules benignes, sigui en biòpsies d'agulla o en mostres de RTUp, hauria de ser considerada com a factor rellevant alhora de realitzar una VA més estricta en aquests pacients.

Respecte a les **metàstasis**, la incidència de *TMPRSS2-ERG* en CaPr clínicament localitzat i el càncer metastàtic resistent a castració és força similar. Perner *et al.* [99] van reportar respectivament unes freqüències del 48,5% i del 33%, mentre que Saramaki *et al.* van descriure una incidència lleugerament superior en el cas dels tumors metastàsics (37%) [101]. Aquestes dades juntament amb les evidències d'altres estudis on es mostra que els focus metastàsics en un mateix pacient són uniformement positius o negatius respecte l'estatus de les fusions *ETS*, recolzarien que la "sembra metastàsica" es produeixi a partir d'un sol focus [79,102].

Respecte a la **supervivència i el pronòstic** en pacients amb la translocació *TMPRSS2-ERG*, alguns autors com Weischenfeldt *et al.* [103] i Steurer *et al.* [104] han correlacionat la presència del reordenament amb una aparició més primerenca del CaPr. Una explicació

plausible a aquest fet seria que en pacients més joves es troba una senyalització androgènica més elevada. Attard *et al.* comparant una cohort d'homes sense la fusió amb una altre on sí estava present, va demostrar que en aquesta última el pronòstic i la supervivència eren clarament pitjors [105]. Prèviament, Perner *et al.* havien descrit una associació estadísticament significativa entre els tumors amb reordenament de *TMPRSS2-ERG* produït per deleció i un estadiatge més avançat, així com amb la presència de metàstasis en ganglis limfàtics pèlvics, associant la fusió mitjançant deleció amb trets de progressió tumoral [106]. Tanmateix, en aquest terreny hi ha força discrepàncies. D'una banda, hi ha treballs que descriuen associacions entre les fusions dels gens *ETS* i trets cancerígens que confereixen pitjor pronòstic i un fenotip més agressiu [93,106-108]. En aquest sentit, Tomlins *et al.* suggereixen que els CaPr *TMPRSS2-ERG* positius, sinó es tracten, poden tenir un curs clínic més virulent que aquells sense la translocació, fent èmfasi en una detecció més precoç [109]. Demichelis *et al.* van descriure una correlació estadísticament significativa entre la presència de *TMPRSS2-ERG* i un fenotip tumoral més agressiu responsable de l'aparició de metàstasis o de mort per malaltia [110]. Finalment, Attard *et al.* van correlacionar significativament *TMPRSS2-ERG* amb majors GS, estadiatges clínics més avançats i nivells basals de PSA sèric més elevats [105]. D'altra banda, hi ha estudis en els quals es descriuen associacions entre el gen de fusió i GS més baixos [111] i un major temps de supervivència lliure de recurrència [101].

En l'esforç de caracteritzar altres alteracions estructurals en CaPr, al llarg dels anys s'han descrit també fusions entre *TMPRSS2* i altres membres de la família de gens *ETS*, com són **ETS Variant 1 (ETV1)** (7p21.2), **ETS Variant 4 (ETV4)** (17q21.31), **ETS Variant 5 (ETV5)** (3q27.2) i Friend Leukaemia Virus Integration 1 (*FLII*) (11q24.3).

Al 2005, Tomlins *et al.* [90] van descriure que el 57% dels CaPr presentaven sobreexpressió d'*ERG* o *ETV1*, suggerint a més que aquestes fusions genètiques són la causa més probable d'aquesta sobreexpressió, i confirmant el seu caràcter mútuament exclouent. En aquest sentit, Attard *et al.* també van descriure reordenaments genètics del gen *ETV1* en un 5.4% dels tumors de pròstata [112].

Més tard, al 2006 també Tomlins *et al.* van caracteritzar una nova fusió entre els gens *TMPRSS2* i *ETV4*, present en només el 2% dels casos [113]. Estudis addicionals van permetre també la identificació del gen *ETV5* com el quart membre de la família *ETS* involucrat en els reordenaments genètics en CaPr. Helgeson *et al.* [114] van caracteritzar dos

casos amb fusions d'aquest gen. Concretament, un cas presentava *TMPRSS2:ETV5* i l'altre *SLC45A3:ETV5*, representant aproximadament un 1% dels casos amb translocacions.

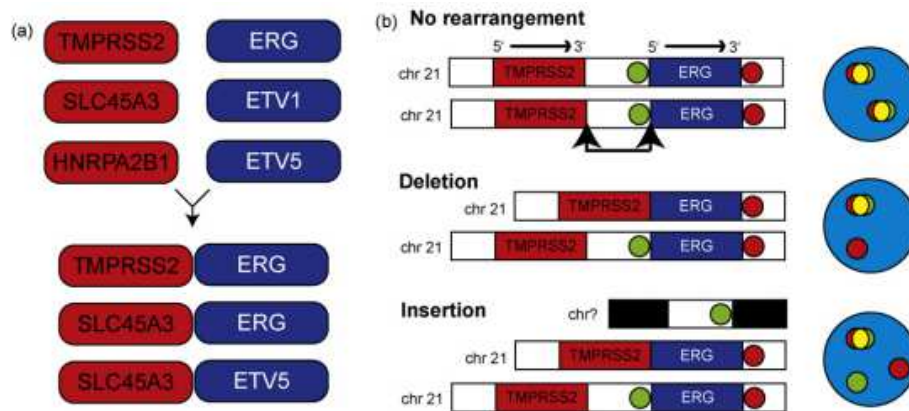


Figura 9: Complexitat de les fusions genètiques de la família ETS i possibles variants. (a) Gens de la família ETS (blau) principalment implicats en les translocacions i els múltiples *partners* descrits (vermell). (b) Mecanismes genètics identificats a partir dels quals es produeix el gen de fusió *TMPRSS2-ERG*, per deleció (*fletes*) o inserció en un altre cromosoma [112].

El reordenament *TMPRSS2-ERG* representa el 90% de totes les fusions que s'han descrit entre *TMPRSS2* i membres de la família de gens *ETS* [77,115,116]. Conjuntament, les fusions que impliquen *ETV1*, *ETV4* i *ETV5* representen un 5-10% dels CaPr [93,112]. D'altra banda, aquesta família de gens pot també fusionar-se amb altres parelles. El segon *partner* d'*ERG* més freqüent en CaPr és el gen *SLC45A3* (Solute Carrier Family 45, membre 3 gene) [117-120]. La proteïna codificada per aquest gen, també anomenada prostestina, és un marcador específic de l'epiteli prostàtic benigne i maligne, que no s'ha detectat fins al moment en altres teixits [120]. Al 2013 Perner *et al.* [121] van reportar que la pèrdua d'expressió de *SLC45A3* com a resultat del reordenament genètic s'associava estadísticament amb un menor temps de recurrència bioquímica i un major GS. D'altra banda, la coexistència de les translocacions *TMPRSS2-ERG* i *SLC45A3-ERG* s'ha descrit en alguns tumors prostàtics, demostrant-se que es poden produir múltiples reordenaments simultanis dintre d'una mateixa neoplàsia [119,120-122]. Els resultats d'Hernández *et al.* [123] van posar de manifest per primera vegada la relació entre el reordenament únic de *TMPRSS2-ERG* i tumors amb un $GS \leq 7$, i la presència de dobles reordenaments *TMPRSS2-ERG* i *SLC45A3-ERG* amb tumors amb $GS \geq 8$. A més, també s'ha descrit que *SLC45A3-ERG* apareix més freqüentment com a segona fusió en casos que ja presenten el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* [119,120]. Cal destacar la baixa incidència de fusions *SLC45A3-ERG* en

tumors GS=6 i la tendència a incrementar-se en neoplàsies $GS \geq 7$, fet que suggereix que l'aparició d'aquesta fusió podria estar relacionada, directa o indirectament, amb la transició de patrons de GS 3 a 4. Els resultats de Font-Tello *et al.* [108] suggereixen que les dobles fusions *TMPRSS2-ERG* i *SLC45A3-ERG* tenen per sí mateixes un efecte important respecte el grau tumoral i el pronòstic. Estudis posteriors [124] van demostrar a més que els CaPr amb el fenotip denominat “triple hit” (ERG positiu / *SLC45A3* perdut / *PTEN* perdut) progressen més ràpidament, presentant un menor temps de supervivència lliure de progressió bioquímica. A més, en aquest treball es fa èmfasi en què els tumors amb aquest fenotip haurien de ser exclosos de VA i ser considerats com a candidats per teràpies intenses.

1. 8. 2. Tumors “ETS-negatiu”

Speckle-type POZ (SPOP) és una ubiquitina ligasa, que catalitza la transferència de ubiquitina a substrats proteics particulars marcant-los per a la seva degradació mitjançant el proteosoma. Les mutacions al gen *SPOP* s'han descrit en un 8-14% dels tumors prostàtics [125], afectant a aminoàcids específics localitzats a la fenedura d'unió al substrat proteic. Malgrat els mecanismes pels qual es produeix aquest fenomen encara no estan prou definits, aquesta localització tant concreta de les mutacions d'*SPOP* suggereix que aquestes van adquirint durant la carcinogènesi una selecció positiva alterant les seves unions als diferents substrats així com el procés d'ubiquitinització, afavorint d'aquesta manera la tumorogènesi. S'ha descrit que les mutacions del gen *SPOP* són mútuament excloents amb les fusions del gens *ETS*. De fet, s'ha definit l'existència d'una subclasse molecular *ETS*-negativa, amb un caràcter mútuament excloent amb l'*ETS*-positiva [81,85].

En aquest sentit, hi ha força estudis que han demostrat que els CaPr *ETS*-positius i *ETS*-negatiu presenten perfils transcripcionals diversos, suggerint-se que representen malalties diferents [100]. Tanmateix, les alteracions moleculars clau en els tumors *ETS*-negatiu encara no estan ben definides i, en l'esforç de caracteritzar nous biomarcadors, Tomlins *et al.* van identificar que la proteïna **SPINK1 (Serine Peptidase Inhibitor Kazal type 1)** es troba sobreexpressada en un 10% dels CaPr *ETS*-negatiu [126].

1. 8. 3. Desenvolupament prostàtic i regulació androgènica

Epidermal Growth Factor (EGF) i el seu receptor (EGFR) també s'han relacionat amb la progressió tumoral i, al disposar de fàrmacs específics dirigits, existeix un interès creixent en aquestes molècules. *EGF/EGFR* es poden trobar expressats de forma aberrant tant al CaPr androgen-independent com al metastàtic, i s'associen amb un fenotip agressiu, GS elevat, pronòstic pobre i temps de supervivència disminuït, contribuint així al desenvolupament del CaPr resistent a castració i a la progressió metastàsica [127-130]. Estudis recents posen de manifest el paper que desenvolupen *EGF/EGFR* en la senyalització cel·lular induint el procés conegut com a transició epiteli mesènquima (EMT), en el qual de forma gradual les cèl·lules epitelials perden les seves característiques intrínseques, adquirint trets propis de les cèl·lules mesenquimals [129]. Als carcinomes, en general, l'EMT i la sobreexpressió d'EGFR són events pràcticament simultanis, que es relacionen amb un risc augmentat d'aparició de metàstasis [131,132]. Particularment, al CaPr hi ha cada vegada més treballs que recolzen l'associació d'EMT amb una evolució tumoral més agressiva. El CaPr és la tercera neoplàsia en la qual les mutacions a *EGFR* presenten una major prevalença, sent l'alteració més freqüent la sobreexpressió proteica. De Muga *et al.* van descriure la presència d'alteracions moleculars combinades a la via d'*EGFR-PTEN* en aproximadament el 35% de les neoplàsies de pròstata, afectant de forma més significativa als tumors d'alt GS i estadis patològics avançats [133].

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) és un gen que es relaciona amb carcinomes urotelials de baix grau histològic i amb bon pronòstic, ja que aquests tumors freqüentment es diagnostiquen en estadis poc avançats. Aquesta associació està documentada de forma extensa a la literatura [134,135]; no obstant, *FGFR3* està relativament poc estudiat en CaPr. Els resultats publicats per Hernández S *et al.* [136] indiquen que l'aparició de mutacions en aquest gen s'associa de forma estadísticament significativa amb CaPr amb GS combinat 6 (3+3), sense descriure la seva presència en càncers amb GS ≥ 8 ni metàstasis. No obstant, no sembla tractar-se d'un gen cabdal en la carcinogènesi prostàtica, si bé la presència de certes alteracions estructurals ha permès descriure un subgrup de tumors prostàtics de baix grau i la seva relació amb l'aparició de tumors indolents, principalment originats a bufeta i pell. Tanmateix, malgrat la informació científica generada, continua sense definir-se clarament si existeix o no una relació

patogènica entre el càncer de bufeta urinària i el de pròstata que pugui estar mediada per aquest gen.

La família de les **Glutation-S-Transferases (GSTs)** comprèn múltiples proteïnes, l'activitat de les quals és fonamentalment la de catalitzar certes reaccions bioquímiques per tal de detoxificar l'organisme. Cal destacar el rol del gen *GST* classe pi (***GST-pi***), com a gen protector (*caretaker gene*), donat que preveu les conseqüències ocasionades pel dany i patiment cel·lular [137]. Jiang *et al.* destaquen *GST-pi* com un dels gens que es troba aberrantment hipermetilat al CaPr (70-80% dels tumors) a diferència de la HBP, condició en la que habitualment es troba hipometilat [138]. Altres autors com Martignano F *et al.* [139] confirmen immunohistoquímicament que la metilació comporta una pèrdua d'expressió proteica, de forma que la proteïna GSTP1 s'expressa tant a les cèl·lules basals com luminals de les glàndules benignes, únicament s'expressa a les cèl·lules basals de les glàndules amb PIN i, l'expressió es negativitza a les glàndules tumorals. En aquest sentit, la pèrdua progressiva de GSTP1 des de l'epiteli glandular normal, al pre-neoplàsic i finalment al tumoral, podria constituir un dels canvis genètics més inicials en la carcinogènesi prostàtica.

Homeobox Gene NKX3.1 (*NKX3.1*) pertany a la família de gens de tipus homeobox ó homeòtics, és a dir, que codifiquen factors de transcripció específics i s'encarreguen de regular la formació i diferenciació d'òrgans, actuant també com a supressors tumorals. Concretament, *NKX3.1* és un gen homeobox regulat per andrògens, específic de la pròstata, que té un paper crític en el seu desenvolupament morfològic i actua també com a supressor tumoral, regulant negativament el creixement cel·lular epitelial. Malgrat que no s'han identificat mutacions concretes en aquest gen mitjançant estudis moleculars convencionals [86], Baca *et al.* descriuen la pèrdua de *NKX3.1* com a event inicial en la tumorogènesi prostàtica (*gatekeeper event*) [78]. A nivell cromosòmic, dintre de les alteracions del nombre de còpies (CNA), la pèrdua més freqüent en CaPr implica al braç curt del cromosoma 8, concretament l'interval 8p21.3-p21.2, que conté el gen *NKX3.1* a la citobanda 8p21.2. En una meta-anàlisi publicada per Williams *et al.*, la deleció de 8p va ser el CNA més recurrent dels casos analitzats, amb un total de 61,8% (409/662) de tumors afectats. Respectivament, la incidència d'aquesta alteració va ser del 55,7% i del 90,5% en càncers òrgano-confinats i avançats [140].

El **receptor d'androgen (AR)** és un receptor hormonal nuclear la regulació del qual és crucial en el desenvolupament del teixit prostàtic normal i cancerós. La zona d'unió de l'AR

es troba implicada en la iniciació tumoral ja que aquesta regió està pròxima als punts de ruptura que a nivell cromosòmic donen lloc als reordenaments [78]. Per aquest motiu, actualment el bloqueig de la via androgènica continua sent el pilar fonamental del tractament alternatiu a la cirurgia, malgrat que en la majoria dels casos únicament suposa una forma de posposar la inevitable progressió de la malaltia.

S'han descrit alteracions en diferents gens que poden modular l'activitat de l'AR com, per exemple, el **Nuclear Receptor Co-Activator 2 (NCOA2)** i el **Forkhead-Box A1 (FOXA1)**. En pacients no castrats que tenen tumors prostàtics amb mutacions de *NCOA2*, sobreexpressió o nivells elevats d'amplificació, s'ha observat una major probabilitat de recurrència [84]. D'altra banda, *FOXA1* és un cofactor de l'AR que es troba mutat de forma recurrent tant en tumors primaris com metastàsics [85] amb una freqüència d'aproximadament el 2,9% [141]. L'expressió de *FOXA1* sembla que incrementa la proliferació cel·lular en presència androgènica i podria tenir un rol en la progressió a CaPr resistent a castració [81]. En aquest sentit, Visakorpi *et al.* van suggerir que l'amplificació de l'AR emergeix durant la teràpia de deprivació androgènica, facilitant el creixement cel·lular en ambients tumorals amb baixes concentracions d'androgen. En aquest treball es van realitzar tècniques d'hibridació genòmica comparada que varen mostrar amplificació de la regió Xq11-q13, on es troba el AR, en un 30% dels tumors estudiats que presentaven recurrència durant la deprivació androgènica [142].

1. 8. 4. Vies clàssiques de regulació i senyalització cel·lular

1. 8. 4. 1. Via PI3K-AKT

Les vies de senyalització cel·lular de la fosfatidilinositol 3-quinasa (*PI3K*)–*AKT* i *RAS*–*MAPK* es troben desregulades en una àmplia varietat de tumors en l'ésser humà, ja sigui per guany o bé, per pèrdua d'alguns dels components que hi participen en la seva regulació, com per exemple, *PTEN*. La família d'enzims *PI3K* desenvolupen funcions cel·lulars tals com el creixement, la proliferació i la diferenciació així com la motilitat i la supervivència de les cèl·lules. Les alteracions en aquesta via de senyalització cel·lular, particularment al gen *PTEN*, tenen un pes important al CaPr, sent per aquest motiu una potencial diana terapèutica. Malgrat que les alteracions mutacionals a *PI3KCA-AKT* són infreqüents en aquests tumors, Barbieri *et al.* van reportar que *PIK3CA* presenta amplificacions i mutacions activants en un 25% i un 5% d'aquests càncers, respectivament [85]. Agell *et al.* [143] van descriure que en

alguns d'aquests tumors, concretament als d'alt grau, la via de *PI3KCA-AKT* es troba activada, sigui per sobreexpressió de l'ARN missatger (mARN) de *PI3KCA* o bé, per augment del nombre de còpies d'aquest gen, fet que comporta una sobreexpressió proteica d'AKT.

Phosphatase and Tensin Homolog (*PTEN*) (10q23), és un gen supressor tumoral amb funcions reguladores a nivell del cicle cel·lular i adhesió cel·lular. Controla la via de senyalització de *PI3KCA-AKT* mitjançant la defosforilació d'alguns intermediaris per tal de desactivar el procés de senyalització cel·lular PI3K-dependent. La pèrdua de *PTEN* comporta un increment en l'activitat d'AKT i, conseqüentment, de la supervivència cel·lular; i ha estat relacionada amb l'edat i amb un estatus ETS-positiu [103]. Les delecions al locus de *PTEN* s'han descrit en un 40% dels CaPr primaris, mentre que les mutacions inactivants en un menor percentatge, aproximadament en un 5-10% [81,85,104]. Baca *et al.* [78] descriuen que les alteracions cromosòmiques comencen a acumular-se en fases inicials de la carcinogènesi prostàtica per conduir, en fases posteriors, a la inactivació de gens supressors tumorals com *TP53* o *PTEN*, les alteracions dels quals són més comunes quan existeix malaltia avançada [81,84]. Actualment, l'associació de la pèrdua de *PTEN* amb tumors prostàtics d'alt grau es troba més àmpliament documentada [144-146]. Un estudi recent ha demostrat que la pèrdua de *PTEN* permetria identificar quins càncers pertanyents a un subgrup de tumors amb GS=6 diagnosticats per biòpsia d'agulla tenen major probabilitat de presentar un major GS a la peça de PR. Així, els tumors amb pèrdua proteica de *PTEN* tenen major risc de ser sobregradats amb l'anàlisi de la PR, respecte d'aquells que no presenten aquesta pèrdua [147]. Diferents treballs han relacionat els reordenaments d'*ERG* i la pèrdua d'expressió de *PTEN* amb la formació de tumors prostàtics més agressius [108,148-150]. D'altra banda, Halvorsen *et al.* van reportar que la pèrdua combinada de *PTEN* i *p27* s'associa amb una major proliferació intratumoral detectada amb Ki-67 així com amb un risc incrementat de recurrència en aquells casos de CaPr òrgano-confinats [151]. Un estudi recent també descriu diferents patrons moleculars d'expressió de *PTEN* i *p27* als tumors amb patró de Gleason 4, sent diferent en aquells que presenten morfologia cribiforme respecte dels que no la presenten, suggerint que les pèrdues de *PTEN* o de *p27* podrien ser marcadors pronòstics diferencials alhora de caracteritzar neoplàsies amb aquestes variants de Gleason 4 [152].

1. 8. 4. 2. Via MAPK-ERK

La **via de senyalització MAPK-ERK** presenta un rol cabdal en altres càncers, malgrat que al de pròstata el seu paper està poc definit. S'ha reportat que la via podria estar alterada en tumors avançats [84] i també s'ha implicat com a potenciadora de l'activitat transcripcional de l'AR. Les mutacions a *KRAS* i *BRAF*, proteïnes quinases que es troben a l'inici de la via RAF-MEK-ERK (MAPK), s'han descrit en aproximadament un 10% dels pacients asiàtics però són molt infreqüents a la raça caucàsica [81,84,85].

1. 8. 4. 3. TP53, KLF6 i Retinoblastoma

Les alteracions genètiques que condueixen a un cicle cel·lular descontrolat són crucials en l'oncogènesi. Al CaPr, les mutacions als oncogens i gens supressors tumorals més freqüents no presenten una elevada prevalença. Concretament, les alteracions moleculars al **Tumor Protein p53 (TP53)**, un gen supressor tumoral clàssic, s'han reportat amb una freqüència oscil·lant entre 3-42 %, presentant-se amb major freqüència en tumors en estadis avançats i/o metàstasis, i considerant-se doncs un fenomen tardà en la carcinogènesi prostàtica [141]. En models murins de CaPr, la inactivació de *TP53* és necessària per tal de sobrepassar els mecanismes de senescència cel·lular que s'activen juntament amb la pèrdua de *PTEN* [153]. La **proteïna del retinoblastoma (RB1)** està codificada per un gen supressor tumoral que controla la transició de la fase G1 a S dins del cicle cel·lular, sent no funcional en múltiples neoplàsies. El gen *RB1* es troba mutat o delecionat més freqüentment en CaPr resistents a castració que en aquells clínicament localitzats, presentant una freqüència de fins al 45% en els primers [81,84].

L'anomenat **Kruppel-Like Factor 6 (KLF6)** és un factor de transcripció codificat pel gen *KLF6*, localitzat a 10p15, que inicialment es va postular com a probable gen supressor tumoral amb un paper rellevant al CaPr. Narla G *et al.* van descriure la presència de mutacions d'aquest gen en un elevat nombre de tumors prostàtics [154], considerant que aquestes alteracions constituïen una via alternativa i independent a les descrites a *TP53*. Tanmateix, estudis recents demostren que realment *KLF6* està mutat en una minoria de casos de CaPr [155], constatant-se a més, que les xifres de mutacions aportades en algunes sèries s'aproxima a la xifra d'artefactes reportades en altres estudis [156], i que per tant, en alguns no s'aplicaven els procediments pertinents per tal de descartar que les alteracions fossin purament artefactuals.

1. 8. 5. Gens reparadors de l'ADN: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* i *PMS2*

El sistema de reparació d'errors de l'emparellament de l'ADN (Sistema MMR) és un important mecanisme d'excisió-resíntesi present en organismes procariotes i eucariotes, que actua com un sensor del dany genòmic, detecta i corregeix errors generats durant la replicació de l'ADN i promou l'estabilitat genètica. En organismes eucariotes, s'han identificat els complexos denominats hMutS i hMutL (homòlegs a MutS i MutL descrits prèviament en bacteries), els quals reconeixen els errors en l'emparellament de les bases de l'ADN. Els complexos hMutS i hMutL formen heterodímers, cadascun dels quals desenvolupa funcions específiques. A l'actualitat, els complexos més ben estudiats són **hMutS α** i **hMutL α** , formats respectivament pels gens *MSH2* i *MSH6*, i *MLH1* i *PMS2* (Post-Meiotic Segregation 2). Existeixen altres proteïnes que pertanyen al Sistema MMR com, per exemple, *MSH3*, *MLH3* i *PMS1*, la funció de les quals encara no està clarament definida. En el procés d'excisió i resíntesi, també intervenen altres enzims com el PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), l'exonucleasa EXO1 i les ADN polimerases [157].

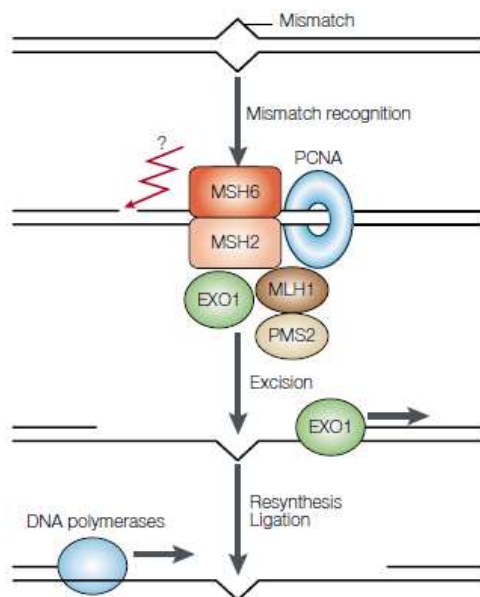


Figura 10: Sistema de reparació d'errors de l'emparellament de l'ADN (Mismatch Repair System) [157]

MSH2 s'uneix a *MSH6* o *MSH3* per formar hMutS α o hMutS β , i *MLH1* fa el mateix amb *PMS2*, *PMS1* o *MLH3* per formar hMutL α , hMutL β o hMutL γ . *MSH2* i *MLH1* constitueixen els gens dominants dels respectius heterodímers que integren.

Depenent de si es tracta d'un desparellament simple o d'una deleció o inserció major, actuarà el complex *MSH2-MSH6* (hMutS α) o *MSH2-MSH3* (hMutS β), respectivament (**Figura 11**).

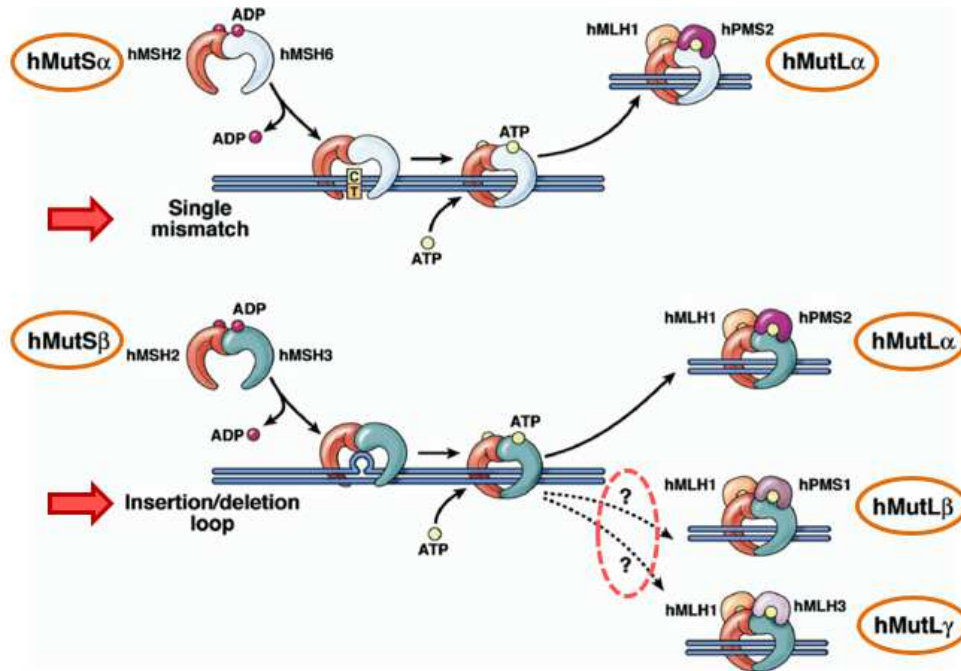


Figura 11: Esquema de funcionament dels diferents heterodímers que constitueixen el sistema reparador d'errors de l'emparellament de l'ADN (Mismatch Repair System) [158].

L'heterodímer *MLH1-PMS2* (hMutL α) interacciona amb *MSH2-MSH6* o *MSH2-MSH3*, potenciant així el reconeixement del desaparellament de bases [158-162]. De forma similar a hMutL α , *MLH1-MLH3* (hMutL γ) es creu que també repara insercions i/o deleccions.

1. 8. 5. 1. Defectes dels gens *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* i *PMS2* i càncer de pròstata

Els defectes als gens reparadors de l'ADN (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1* i *PMS2*) afavoreixen l'acumulació d'alteracions als microsatèl·lits, que són seqüències repetitives de nucleòtids disperses al llarg del genoma i que tenen un major risc d'errors durant la replicació de l'ADN. Les alteracions als microsatèl·lits donen lloc a la denominada **inestabilitat de microsatèl·lits** (IMS), que pot tenir com a conseqüència l'emergència de mutacions somàtiques significatives i la conseqüent inducció de tumors malignes [163-165].

El procés de reconeixement d'errors pot ser iniciat tant per l'heterodímer *MSH2-MSH6* (hMutS α) com per *MSH2-MSH3* (hMutS β). Per aquest motiu, alguns dels errors en la replicació de l'ADN es poden reparar malgrat *MSH6* i/o *PMS2* (gens no dominants dins de l'heterodímer que formen), no siguin funcionants [165]. D'una banda pel concepte de dominància dels gens que integren els heterodímers, com són els gens dominants *MSH2* i

MLH1. D'altra, degut als altres complexos descrits que comparteixen el rol de detectar possibles errors i que, en determinades situacions, poden suplir la funció del complex no funcionant en qüestió.

El rol dels gens reparadors de l'ADN i les proteïnes codificades per aquests s'ha estudiat extensament al càncer colorrectal i d'endometri. El Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) va reportar que el 16% dels tumors de colon i fins a un 35% dels tumors endometrials presenten un **fenotip hipermutat**. En ambdós tipus de càncer, un grup considerable de tumors hipermutats estaven associats a IMS, més freqüentment degut al silenciament epigenètic de *MLH1* [166,167]. Tanmateix, existeix controvèrsia sobre el rol dels gens reparadors de l'ADN en quant al desenvolupament i progressió del CaPr, ja que les alteracions genètiques que condicionen IMS no estan ben definides en aquest tipus de càncer. Fora de l'espectre de la Síndrome de Lynch, hi ha relativament pocs estudis que reportin defectes a les proteïnes del Sistema MMR al CaPr [168-175], i els mecanismes subjacents que condicionen aquestes deficiències, així com el seu significat clínicopatològic i les possibles repercussions, encara romanen per aclarir.

Recentment, Guedes *et al.* [169] van publicar un estudi sobre el paper de *MSH2* en CaPr, detectant pèrdua d'expressió d'aquesta proteïna en un 1,2% dels casos estudiats, incloent ADCs primaris i carcinomes neuroendocrins prostàtics de cèl·lula petita. La pèrdua d'expressió de *MSH2* semblava ser més freqüent en tumors prostàtics d'alt grau, estant fortament relacionada amb defectes d'inactivació subjacents i fenòmens d'hipermutació. Prèviament, Pritchard *et al.* [164] havien descrit un subtipus hipermutat i avançat de CaPr associat a IMS, amb defectes estructurals més freqüentment als gens *MSH2* i *MSH6*. Al 2015, Basu *et al.* [165] van reportar també en CaPr una reducció significativa de l'expressió dels gens *MSH2*, *MSH6* i *MLH1*, establint la seva deficiència com a signe distintiu entre el CaPr i la HBP. Així mateix, Schweizer i col·laboradors [176] van reportar alteracions dels gens del Sistema MMR associades amb hipermutacions en un 40% dels pacients amb CaPr amb trets histològics propis del tipus ductal.

Tal i com s'ha descrit prèviament, alguns estudis han associat la pèrdua d'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN amb el desenvolupament de càncer i amb trets menys favorables en CaPr [169,177]. Però també n'hi d'altres que suggereixen que el dany genòmic tumoral podria desencadenar la sobreexpressió d'aquestes proteïnes, i relacionen la seva sobreexpressió amb una major agressivitat tumoral i un pitjor pronòstic pel pacient [171-174]. En aquest sentit, la sobreexpressió de *MSH2* i/o de *MLH1* ha estat prèviament

reportada en altres neoplàsies malignes, com el càncer de pulmó de cèl·lula no petita [178], el càncer gàstric [179] o els tumors cerebrals malignes [180], entre d'altres. En CaPr, contràriament als resultats de Basu *et al.* [165], Velasco *et al.* [181] van descriure sobreexpressió de MSH2 en teixit prostàtic benigne respecte del maligne. La intensitat de la immunotinció va ser major (71%) en les mostres tumorals respecte de les mostres amb teixit prostàtic normal i amb HBP, en les quals la intensitat de MSH2 va ser respectivament mínima o baixa, i lleugerament incrementada en les cèl·lules basals i luminals (32%). D'altra banda, Norris *et al.* [171] van reportar per primer cop una elevació significativa de PMS2 en teixit prostàtic pre-neoplàsic i tumoral, suggerint d'aquesta manera una relació entre la sobreexpressió dels gens del Sistema MMR i la tumorigènesi del CaPr. A més a més, aquesta relació mostrava independència d'estatus de PMS2 respecte el seu *partner* dominant dins l'heterodímer, MLH1. Posteriorment, Wilczak i col·laboradors [175] van mostrar que els nivells d'expressió elevats de MSH6, MLH1 i PMS2 són esdeveniments relativament freqüents en CaPr, particularment en tumors amb un estadiatge patològic avançat, i associats amb un pitjor pronòstic (major GS, metàstasis ganglionars i una recurrència bioquímica precoç). Aquesta associació va ser particularment més forta en neoplàsies que no presentaven el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* ($P < 0.0001$).

La recent aprovació per la U.S. Food and Drug Administration (FDA) del tractament inhibidor de PD-1 (pembrolizumab) basat en la immunoteràpia, per aquells pacients adults i pediàtrics amb tumors sòlids no ressecables o metastàsics, amb inestabilitat de microsatèl·lits alta o bé amb tumors sòlids que hagin mostrat deficiència als gens reparadors de l'ADN, hagin progressat a tractament previ i no disposin d'alternatives terapèutiques satisfactòries, independentment de quina sigui la seva histologia (“*tumor agnostic*”), [182-184] ha donat molta rellevància a la recerca sobre el paper dels gens reparadors de l'ADN al CaPr.

1. 8. 6. Càncer de pròstata hereditari

Aproximadament, s'estima que un 5-10% dels casos de CaPr estan associats amb predisposició genètica [185]. Lichtenstein *et al.* [186] van publicar un extens treball sobre la diferència en l'ocurrència de CaPr en bessons monozigòtics i dizigòtics, que va revelar que un 42% d'aquests tumors són potencialment atribuïbles a risc hereditari, més que el càncer

colorectal (35%) i el càncer de mama (27%). Estudis posteriors com el de Hjelmberg *et al.* [187] descriuen un risc d'heretabilitat mig del CaPr de fins a un 58%.

1. 8. 6. 1. Altres gens reparadors de l'ADN: *BRCA*

La primera associació que, via germinal, va mostrar una predisposició clara a patir CaPr es va descriure amb el gen *BRCA2*, definida pel Breast Cancer Linkage Consortium. Van estimar que les mutacions germinals a *BRCA2* conferien un risc incrementat x5 de desenvolupar aquest tipus de neoplàsies. De forma similar, les mutacions a *BRCA1* també s'han associat amb una major predisposició. Actualment, ja són molts els estudis que han reportat que les mutacions en aquests dos gens es relacionen clarament amb un curs clínic més agressiu i un pitjor pronòstic de la malaltia [89,188]. A més, recentment s'ha suggerit que els homes pertanyents a famílies amb càncer hereditari de mama i ovari poden tenir un risc incrementat de patir CaPr [185].

1. 8. 6. 2. Síndrome de Lynch

La Síndrome de Lynch (SL) és una alteració genètica hereditària caracteritzada per conferir una forta predisposició a patir càncer. Aquest trastorn segueix un patró d'herència autosòmica dominant i està causat per una mutació germinal en algun dels gens reparadors de l'ADN: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* i *PMS2* o bé, per delecions a l'extrem 3' del gen *EPCAM*, adjacent a *MSH2*, que pot donar lloc a inactivacions d'aquest últim [189]. A la SL, la mutació recurrent més freqüent als gens reparadors de l'ADN en humans és la A→T de l'intró 5 (c.942+3A>T) de *MSH2* [190]. Les mutacions germinals produïdes, seguides d'una mutació en un segon al·lel (deleció cromosòmica o inactivació epigenètica per hipermetilació) condicionen una pèrdua de funció del Sistema MMR, causant l'acumulació de mutacions. Aquestes alteracions genètiques concatenades poden ocasionar la formació de tumors amb un fenotip hipermutat, fet que es manifesta com a IMS, i que pot detectar-se per la pèrdua d'expressió immunohistoquímica d'una o més de les principals proteïnes constituents d'aquest sistema reparador de dany genòmic. El diagnòstic definitiu de la SL s'obté mitjançant seqüenciació genètica tot i que hi ha estudis com el de Hampel H. *et al.* que suggereixen que l'efectivitat del cribratge de la SL amb l'anàlisi immunohistoquímic de les proteïnes reparadores de l'ADN (sensibilitat del 93%) pot ser similar a l'estudi de la IMS mitjançant genotipat [190]. La freqüència de mutacions patogèniques als gens del Sistema MMR en la població general s'ha estimat entre 1:660 i 1:2000, aproximadament [191].

La SL incrementa el risc de patir múltiples càncers, sent els més freqüents el càncer colorectal i el d'endometri. Tot i així, hi ha un espectre de tumors extra-còlics i extra-uterins associats originats a ovari, estómac, intestí prim, pàncrees, urèter i pelvis renal, cervell i neoplàsies de glàndules sebàcies [192,193]. Està ben documentat que les neoplàsies de tracte urinari superior (pelvis renal i urèter) representen el tercer càncer més freqüent associat a la SL (5%), després del càncer colorectal i endometrial [194], i s'ha relacionat un risc major a desenvolupar aquest tipus de neoplàsies en portadors de mutacions a *MSH2* i *MLH1* [195]. En canvi, el CaPr i el de mama actualment no es consideren part de l'espectre de tumors associats a la SL.

1. 8. 6. 2. 1. Càncer de pròstata i Síndrome de Lynch

Actualment, el cribratge del CaPr en pacients amb SL és el mateix que per la població general, ja que fins al moment no es considera una neoplàsia associada a l'espectre d'aquesta síndrome [196]. Tanmateix, existeix certa controvèrsia sobre aquest tema ja que alguns estudis [197-199], en base a l'evidència existent a la literatura actual, recolzen que el CaPr sigui considerat com a part d'aquest espectre associat a la SL. Concretament, hi ha treballs que han reportat una incidència significativament major a desenvolupar CaPr en pacients portadors de mutacions als gens del Sistema MMR en comparació amb la població general, més freqüentment en portadors de mutacions a *MSH2* respecte de *MLH1* i *MSH6* [195, 196, 200-202]. Raymond *et al.* [202] van publicar un estudi en el qual es mostrava un risc acumulat dues vegades major de patir CaPr en individus amb SL respecte a la població general, lleugerament major en aquells portadors menors de 60 anys, i especialment en portadors de *MSH2*. En la mateixa línia, Barrow *et al.* [195] van reportar un risc x10 a desenvolupar CaPr en portadors de mutacions a *MSH2*. Contràriament, treballs com el de Haraldsdottir S *et al.* [196] reporten que en pacients amb SL no sembla que el CaPr presenti un fenotip més agressiu o es desenvolupi a edats més joves, respecte de la població general. Altres estudis com el d'Engel *et al.* [201] destaquen que els càncers menys freqüentment associats a la SL també mostren riscos òrgano-específics diferents segons el gen reparador mutat, malgrat el substrat d'aquestes diferències encara està per aclarir; i suggereixen que el fet d'incloure als portadors de mutacions a *MSH2* en programes específics de VA per CaPr i per càncer de bufeta urinària seria beneficiós. Barrow *et al.* [195] també van suggerir que en portadors de mutacions a *MSH2* de 40 a 50 anys, les determinacions periòdiques de PSA podrien estar justificades.

2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2. 1. Hipòtesis del treball

En base a les dades publicades a la literatura, la definició d'un subgrup de tumors prostàtics amb un perfil clínic, morfològic i molecular diferent de la resta, basat en les alteracions en l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) podria tenir una utilitat clínica i terapèutica, establint-se un subgrup de tumors amb diferent resposta a la teràpia i diferents paràmetres de supervivència.

Creiem que la caracterització clínica, morfològica i molecular d'aquests tumors d'origen prostàtic pot servir per dissenyar un algoritme més adequat al seu perfil clínic-patològic i al seu context genètic, amb l'objectiu de possibilitar que s'introdueixin millores en el diagnòstic, pronòstic i tractament d'aquests pacients que repercuteixin no només en la seva supervivència, sinó en la seva qualitat de vida.

2. 2. Objectius del treball

El nostre objectiu principal és analitzar l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) així com l'estatus d'ERG i PTEN en una sèrie de casos de CaPr per tal d'identificar i caracteritzar morfològicament un subgrup d'adenocarcinomes prostàtics acinars associats a IMS, conèixer les potencials repercussions clíniques i terapèutiques derivades de la seva alteració en l'expressió, i inferir la seva probable relació amb les variables clínic-patològiques i amb la supervivència lliure de progressió (PSA progression-free survival).

Altres objectius del treball són:

1. Establir la freqüència d'alteracions immunohistoquímiques de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 a la nostra sèrie de casos de CaPr i comparar-les amb la literatura.
2. Analitzar com es relaciona l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN amb els "grups de grau"(OMS, 2016).
3. Determinar la relació entre l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN i l'expressió d'ERG i PTEN, proteïnes codificades per gens pertanyents a la via de les translocacions de la carcinogènesi prostàtica, i tractar d'inferir si es tracta d'esdeveniments que formin part d'una mateixa via carcinogènica o pel contrari de vies excloents.

4. Analitzar si existeix relació entre les alteracions de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2, de forma individual o conjunta, i la supervivència dels pacients, i avaluar la seva potencial utilitat clínica.

3. MATERIALS I MÈTODES

3. 1. Selecció de casos

El nostre estudi inclou l'anàlisi retrospectiva de 228 casos consecutius de CaPr de pacients tractats al Parc de Salut MAR (PSMAR, Barcelona) entre els anys 1999 i 2010. El teixit tumoral analitzat correspon al material obtingut durant la intervenció quirúrgica (prostatectomia radical) realitzada en el transcurs del diagnòstic i tractament de la malaltia. Del total de casos operats en el període de temps indicat, es varen seleccionar aquells en els quals la quantitat de tumor representat fos suficient com per poder realitzar les anàlisis pertinents. Els criteris d'inclusió dels casos queden recollits a la **taula 1**.

Criteris d'inclusió dels casos
Casos consecutius
Disposar de PSA preoperatori
Obtenció de la mostra mitjançant prostatectomia radical
Inclusió total de la mostra
Realització de mapa de lesions macro i microscòpiques
Fixació òptima amb formaldehid
Reactivitat immunohistoquímica òptima
Seguiment clínic continuat dels pacients de com a mínim un mes

Taula 1: Criteris d'inclusió dels casos a analitzar a l'estudi.

Les característiques clíniques dels pacients (edat al diagnòstic, multifocalitat, estadiatge, recidiva bioquímica, temps mig de recidiva, temps lliure de malaltia, estatus actual) i les característiques histopatològiques (GS, GG) dels tumors es descriuen a l'apartat de Resultats (veure apartats 4.1. i 4.2., taules 3, 4 i 5).

El Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC-Parc de Salut Mar) de la nostra institució va aprovar el protocol de l'estudi. Els pacients van signar el consentiment informat per a la utilització del teixit tumoral restant després del diagnòstic patològic de la seva malaltia. Es van anonimitzar les dades de filiació, utilitzant-se un codi específic de biòpsia per a cada pacient al qual es varen vincular les diferents dades derivades de l'estudi.

3. 2. Característiques histopatològiques dels tumors

Dos patòlegs del PSMAR (J.Ll. i N.J.) van revisar els casos inclosos a l'estudi, confirmant en tots ells el diagnòstic histològic de CaPr segons els criteris establerts per l'OMS l'any 2016 [7]. Així mateix, es va assignar a tots els casos el GS i el GG corresponent, paràmetres definits per l'OMS 2016 i descrits a l'apartat d'Introducció.

A més a més, a tots els casos es va valorar el patró histològic predominant del tumor i l'eventual presència de variables morfològiques de l'ADC prostàtic acinar (fenotip atròfic, pseudohiperplàsic, en “anell de segell”, entre d'altres).

En referència al CID de pròstata, nova entitat a la classificació de l'OMS del 2016 [7], també es va valorar l'eventual presència d'un component de CID associat als diferents tumors analitzats.

3. 3. Estudi immunohistoquímic sobre matrius tissulars

3. 3. 1. Construcció de les matrius de teixit

Es van revisar les laminetes tenyides amb Hematoxilina-Eosina (H&E), seleccionant-se les zones de teixit tumoral viable corresponents a les 228 prostatectomies radicals realitzades. De cadascun dels casos, es van seleccionar diverses àrees tumorals amb diferents GS per tal d'augmentar la representativitat. Es van construir un total de 9 matrius tissulars (TMAs) amb el material fixat en formol (tamponat al 10%) i inclòs en parafina, utilitzant una estació manual (Chemicon ATA-100), mitjançant la qual es van obtenir cilindres d'un mm de diàmetre màxim dels blocs de parafina corresponents a cada cas. Concretament, per cadascun dels casos, es van seleccionar des d'un fins a tres cilindres de zones tumorals amb diferents GS. Tots els TMAs contenien, a més a més dels casos problema, 7 cilindres de teixit control no neoplàsic i 2 de teixit control pre-neoplàsic (PIN).

Dels 9 TMAs resultants, es van tallar seccions microscòpiques de 3 µm de gruix, i es van tenyir amb H&E. Finalment, van ser revisades per al menys dos patòlegs per tal de valorar la representativitat dels diferents casos i confirmar el diagnòstic i la gradació histològica. Els estudis immunohistoquímics es van realitzar sobre les seccions obtingudes dels TMAs.

3. 3. 2. Estudi immunohistoquímic

Es van realitzar tincions immunohistoquímiques per a la detecció de MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, ERG i PTEN sobre seccions obtingudes dels TMAs.

Per a cadascuna de les determinacions, es van tallar seccions de 3 µm dels 9 TMAs, que es van disposar sobre portaobjectes amb càrrega electrostàtica positiva, es van estufar durant 1 hora a 60°C per a una correcta adhesió del teixit al portaobjectes i es van desparafinar. Seguidament, es va dur a terme la immunotinció manual pels sis anticossos mitjançant el sistema EnVision Dual Link de Dako (referència: K5007). El procés va començar amb la recuperació antigènica en autoclau. El desenmascarament antigènic dels anticossos MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 es va fer amb solució Tris-EDTA pH 9, a una temperatura de 97°C durant 30 minuts. Pels anticossos ERG i PTEN es va utilitzar solució Tampó Citrat pH 6 a 120°C durant 3 minuts, i Tris-EDTA pH 9 a 100°C durant 30 minuts, respectivament. El següent pas va ser el bloqueig de l'activitat de la peroxidasa endògena. Posteriorment, les mostres es van incubar amb els diferents anticossos primaris durant 60 minuts a temperatura ambient per anti-MSH2 i anti-PMS2, 72 hores a 4°C per anti-MLH1 i anti-MSH6 (tots ells en format "ready-to-use"), 90 minuts a temperatura ambient per anti-ERG [1:100] i *overnight* a 4°C per anti-PTEN [1:200].

Es va continuar amb una incubació de 30 minuts amb un polímer marcat amb HRP conjugat amb anticossos secundaris anti-mouse i anti-rabbit (Dual Link de Dako).

El procediment es va completar amb el revelat de la reacció, utilitzant com a cromogen la diaminobencidina (DAB). La contra-tinció es va fer amb Dako Real Hematoxylin (ref: S2020), es va deshidratar el teixit amb etanol a concentracions creixents i xilè i, finalment, es va fer un muntatge permanent amb DPX i cobreobjectes. A la **taula 2** es detallen els anticossos primaris utilitzats i les dilucions emprades.

Antigen	Clona	Font	Dilució
MSH2	G219-1129	Ventana, Tucson, Arizona, EUA	Prediluit
MSH6	44	Ventana, Tucson, Arizona, EUA	Prediluit
MLH1	M1	Ventana, Tucson, Arizona, EUA	Prediluit
PMS2	EPR3947	Ventana, Tucson, Arizona, EUA	Prediluit
ERG	EPR3864	Epitomics, Burlingame, California, EUA	1/100
PTEN	6H2.1	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca	1/200

Taula 2: Proteïnes analitzades i característiques dels anticossos primaris utilitzats.

3. 3. 3. Lectura immunohistoquímica de les matrius tissulars

Tots els resultats van ser avaluats per dos patòlegs. Aquells casos en què va haver-hi discordança es van revisar de manera conjunta, consensuant-se una única puntuació.

Es va analitzar l'expressió proteica a la població cel·lular tumoral i es va obviar qualsevol altre positivitat corresponent a un altre tipus cel·lular, com, per exemple, les cèl·lules inflamatòries o endotelials. La interpretació dels patrons i dels punts de tall pels diferents anticossos va estar basada en els treballs prèviament publicats a la literatura (informació detallada més avall). Aquesta interpretació va ser en tot moment una estimació visual del percentatge de cèl·lules positives i de la intensitat de la tinció i no es van utilitzar sistemes de digitalització d'imatge per a anàlisis automatitzades.

Per a la valoració de la immunotinció de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2, es va quantificar la intensitat de la tinció nuclear, que és l'expressió constitutiva, i es va considerar com a positiu qualsevol cas que mostrés tinció nuclear, encara que fos focal o dèbil. Perquè l'esdeveniment a detectar fos la pèrdua d'expressió, aquesta havia de ser completa. La tinció citoplasmàtica es va considerar aberrant [203], i no es va valorar. Es van utilitzar com a control intern les cèl·lules limfocitàries, endotelials i fibroblàstiques. Per tal de quantificar la intensitat nuclear, es va aplicar el mètode de quantificació per Histoscore. La fórmula aplicada és la que segueix a continuació: $(0 \times (\% \text{ cells } 0+) + 1 \times (\% \text{ cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ cells } 3+))$. Aplicant aquest mètode es genera una variable contínua de 0 a 300, que representa el valor final per a cada mostra. El resultat s'obté a partir de la suma dels valors obtinguts al multiplicar les diferents intensitats analitzades (immunotinció negativa = 0, immunotinció dèbil i/o focal =1, immunotinció moderada =2, i immunotinció intensa =3)

pel percentatge de cèl·lules tumorals que expressen aquesta determinada intensitat. Els resultats obtinguts es van agrupar en dos grups: Grup 0 (Histoscore = 0 – 10) i Grup 1 (Histoscore = >10 – 300). Finalment, es va seleccionar un cilindre de teixit representatiu per a cada cas, emprant com a principals criteris el GS més elevat i el menor Histoscore nuclear.

Per a la valoració de la immunotinció d'ERG (marcador en el qual no es va requerir una valoració de la intensitat) únicament es van considerar dos patrons d'expressió: tinció nuclear negativa (cap tinció detectable) o positiva (tinció nuclear detectable). Es van utilitzar les cèl·lules endotelials com a control intern positiu [123, 124].

En el cas de l'anàlisi de PTEN, es va utilitzar el següent sistema de puntuació semi-quantitatiu: pèrdua total d'expressió nuclear i citoplasmàtica = 0, pèrdua parcial d'expressió = 1, i expressió intensa, homogènia = 2 [124]. El teixit normal adjacent es va utilitzar com a referència interna. Respecte a l'anàlisi d'ERG i PTEN, es va considerar com a esdeveniment normal la immunotinció negativa enfront d'ERG i la immunotinció homogènia i intensa enfront de PTEN.

Com s'ha esmentat anteriorment, els TMAs contenien teixits control i es va analitzar amb especial atenció l'expressió de cadascun dels marcadors immunohistoquímics en els casos control corresponents a parènquima prostàtic no tumoral i pre-neoplàsic.

3. 4. Anàlisi estadístic

Les anàlisis estadístiques es van portar a terme mitjançant el programa "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) versió 18.0 (Chicago Inc., IL, USA). Una diferència es va considerar estadísticament significativa quan el "p-value" era igual o inferior a 0,05. Les variables qualitatives es van valorar mitjançant freqüències i percentatges, i les variables quantitatives mitjançant mitjanes i rangs. Es van avaluar les variables morfològiques i immunohistoquímiques de manera descriptiva, estudiant-se les relacions estadístiques entre les diferents variables categòriques mitjançant el test exacte de Fisher o el test de Pearson Chi-Square, quan va ser necessari.

Respecte l'anàlisi estadístic de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2), l'expressió de cadascuna de les quatre proteïnes va ser analitzada tant per separat, sense prendre en consideració l'estatus de les altres tres, com avaluant únicament l'estatus de la proteïna dominant dels respectius heterodímers (MSH2 i MLH1). Les diferents combinacions van ser: alteració única, considerada en aquells casos amb expressió anòmala

d'una de les proteïnes i expressió normal de les altres; alteració doble, considerada en aquells casos en què ambdues proteïnes dominants presentaven alteració immunohistoquímica; i estatus *wild-type* (*wt*), quan no es van observar alteracions en l'expressió.

Respecte a l'anàlisi estadístic de les proteïnes ERG i PTEN, l'expressió de cadascuna de les proteïnes es va estudiar individualment. Els resultats obtinguts es varen separar d'acord al fenotip immunohistoquímic de les proteïnes: expressió positiva i negativa d'ERG i PTEN, respectivament.

3. 5. Anàlisi de supervivència

Es va realitzar seguiment clínic dels pacients a intervals regulars cada 3 mesos durant el primer any i cada 6 mesos durant els anys subsegüents, obtenint-se valors de PSA sèric a cadascuna de les visites de control. El seguiment dels pacients va variar des de 1 fins a 212 mesos, amb un valor mig de 102, 5 mesos. Es va definir com a supervivència global l'interval de temps transcorregut entre la data de la intervenció quirúrgica i la data de la mort o l'últim control mèdic del malalt, i es va considerar com a recidiva bioquímica una elevació del PSA sèric postoperatori $> 0,4$ ng/ml. Els pacients van ser controlats fins la data del seu últim control mèdic o bé, quan un increment del PSA sèric $> 0,4$ ng/ml va ser detectat. Aquells pacients als quals se'ls hi va perdre el seguiment es van considerar com a pacients perduts. La supervivència lliure de progressió (PSA progression-free survival) es va analitzar utilitzant les corbes de Kaplan-Meier i per a comparar-les es va emprar el test Log-Rank.

Concretament, es va investigar la supervivència lliure de recurrència de PSA en 200 pacients per a les següents variables: classificació GG, pacients amb pèrdua de MSH2 *vs* pacients amb MSH2 *wt*, pacients amb sobreexpressió de MSH6 *vs* pacients amb MSH6 a nivells basals (*wt*), pacients amb pèrdua de MLH1 *vs* pacients amb MLH1 *wt*, pacients amb pèrdua de PMS2 *vs* pacients amb PMS2 *wt*, pacients amb pèrdua de MLH1 i/o MSH2 *vs* pacients MLH1 i MSH2 *wt*, pacients amb doble pèrdua d'expressió de MLH1 i MSH2 *vs* pacients amb MLH1 i MSH2 *wt*, pacients ERG+ (MSH2 perdut o *wt*) *vs* MSH2 perdut/ERG *wt vs* MSH2/ERG *wt*, i pacients ERG+ (MSH2 i/o MLH1 perduts o *wt*) *vs* MSH2 i/o MLH1 perduts /ERG *wt vs* MSH2/MLH1/ERG *wt* (veure apartat 8, annex 1).

4. RESULTATS

4. 1. Característiques clíniques dels pacients

Del total de la mostra (n = 228), van haver-hi 28 casos no valorables, en el quals l'anàlisi no es va poder realitzar a causa d'alguna de les següents raons: mostres danyades o amb un teixit de pobre qualitat per a ser valorat, *cores* no representats al tall del TMA a valorar, o bé l'absència de representació tumoral al *core* per esgotament del material.

L'edat mitja dels nostres pacients al moment del diagnòstic va ser de 64,71 anys (rang d'edat entre 47 i 80 anys). En un 73% (146/200) dels casos el tumor era multifocal. Respecte a l'estadiatge patològic, un 71,5% (143/200) dels pacients corresponien a un estadiatge T2, un 22% (44/200) a T3a i un 6,5% (13/200) a un estadiatge T3b. Un 46,2% (66/143) dels pacients T2 (T2 (R1)), un 56,8% (25/44) dels pacients T3a (T3a (R1)) i un 69,2% (9/13) dels pacients T3b (T3b (R1)) presentaven marges quirúrgics afectes. En el 100% dels casos el procediment quirúrgic realitzat va ser la PR. Després de la cirurgia, un 19,5% (39/200) dels pacients va presentar recidiva bioquímica, en què el temps mig de recidiva des de la cirurgia fins la progressió va ser de 51,1 mesos (rang de 1 a 165 mesos). Dels pacients amb recidiva bioquímica, els respectius estadiatges patològics havien estat: 23,1% (9/39) T2; 48,7% (19/39) T2 (R1); 2,55% (1/39) T3a; 15,4% (6/39) T3a (R1); 2,55% (1/39) T3b i 7,7% (3/39) T3b (R1). La mitja de temps lliure de malaltia va ser de 102,5 mesos (rang de 1 a 212 mesos). Respecte a l'estatus actual dels malalts, la distribució dels casos va ser la següent: un 75% (150/200) dels pacients estan vius sense malaltia, un 0,5% (1/200) estan vius amb malaltia, un 16,5% (33/200) ha mort per altres causes i cap ha mort per la malaltia. Finalment, un 8% (16/200) dels pacients es van perdre durant el seguiment. A la **taula 3** es resumeix la informació clínica més rellevant.

Variable clínica	Valors
Mitja d'edat (rang)	64,71 (47-80)
Multifocalitat	73%
Estadiatge (T2/T3a/T3b)	71,5% / 22% / 6,5%
Recidiva bioquímica	19,5%
Temps mig de recidiva	51,1 (1-165)
Temps lliure de malaltia	102,5 (1-212)

Taula 3: Resum de les característiques clíniques més rellevants. Per a les variables edat i temps (mig de recidiva i lliure de malaltia), els valors indiquen anys i mesos, respectivament.

4. 2. Característiques histopatològiques dels tumors

Finalment els casos inclosos a l'estudi van ser 200. Aquests es van revisar, es va confirmar el diagnòstic d'ADC prostàtic i seguint els criteris actuals de la ISUP, els GS dels tumors prostàtics van classificar-se de la següent manera: GS $3+3 = 6$ ($n = 39$), GS $3+4$ o $4+3 = 7$ ($n = 108$), GS $4+4$, $3+5$ o $5+3 = 8$ ($n = 33$) i GS $4+5$, $5+4$ o $5+5 \geq 9-10$ ($n = 20$). D'altra banda, aplicant el sistema alternatiu per gradar el CaPr proposat per la ISUP/OMS 2016, els tumors van classificar-se de la següent manera: GG1 ($n = 39$), GG2 ($n = 79$), GG3 ($n = 29$), GG4 ($n = 33$) and GG5 ($n = 20$). Aquests resultats queden recollits a les **taules 4 i 5**.

GS dels tumors analitzats	Freqüència (n = 200) (%)
$3 + 3 = 6$	39 (19,5)
$3 + 4$ o $4 + 3 = 7$	108 (54)
$4 + 4$, $3 + 5$ o $5 + 3 = 8$	33 (16,5)
$4 + 5$, $5 + 4$ o $5 + 5 \geq 9-10$	20 (10)

Taula 4: Freqüència dels diferents GS dels ADCs prostàtics analitzats. Els resultats s'expressen com a números globals i com a percentatges.

GG dels tumors analitzats	Freqüència (n = 200) (%)
GG1 ($3 + 3 = 6$)	39 (19,5)
GG2 ($3 + 4 = 7$)	79 (39,5)
GG3 ($4 + 3 = 7$)	29 (14,5)
GG4 ($4 + 4$, $3 + 5$ o $5 + 3 = 8$)	33 (16,5)
GG5 ($4 + 5$, $5 + 4$ o $5 + 5 \geq 9-10$)	20 (10)

Taula 5: Freqüència dels diferents GG dels ADCs prostàtics analitzats. Els resultats s'expressen com a números globals i com a percentatges.

Els 200 tumors analitzats corresponien a ADCs prostàtics acinars. D'aquests, un total de 13 (6,5%) presentaven variants morfològiques de l'ADC acinar usual: 9 (4,5%) mostraven àrees

de tipus ductal, 2 (1%) fenotip pseudohiperplàsic, 1 (0,5%) mostrava focalment fenotip atròfic i un altre (0,5%) presentava cèl·lules en anell de segell en < 5%.

En un 7,5% dels casos (15/200) es va evidenciar un component de CID acompanyant, que es va confirmar mitjançant la tinció immunohistoquímica front a 34βe12, una citoqueratina d'alt pes molecular que va permetre confirmar la presència de cèl·lules basals als ductes amb lesió tumoral *in situ*.

4. 3. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) i les proteïnes ERG i PTEN en càncer de pròstata

L'expressió immunohistoquímica de les sis proteïnes va ser analitzada en un total de 4.032 *cores* (672 per anticòs) derivats de 228 casos, dels quals finalment, es van poder analitzar un total de 200. D'aquests, en 161 casos, vam disposar de més d'un *core* avaluable per cada cas, i en els 39 restants només es va poder valorar un *core*.

En l'estudi de la proteïna MSH6 van haver-hi 5 casos no valorables (3 corresponents al GG1, i 2 al GG2).

En tots els casos estudiats, el cilindre de teixit amb el major GS va ser considerat com a representatiu del GS global, sent seleccionat per tal d'analitzar la relació entre l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 i els paràmetres clínicopatològics dels casos, així com amb l'estatus d'ERG i PTEN.

L'epiteli prostàtic normal va mostrar nivells variables d'expressió nuclear de les proteïnes reparadores de l'ADN, tant a les cèl·lules luminals com a les basals, particularment a aquestes últimes. La intensitat de l'expressió també va variar de negativa a moderada, sent usualment negativa o dèbil. Imatges representatives de l'expressió d'aquestes proteïnes a l'epiteli prostàtic benigne es mostren a la **figura 12**.

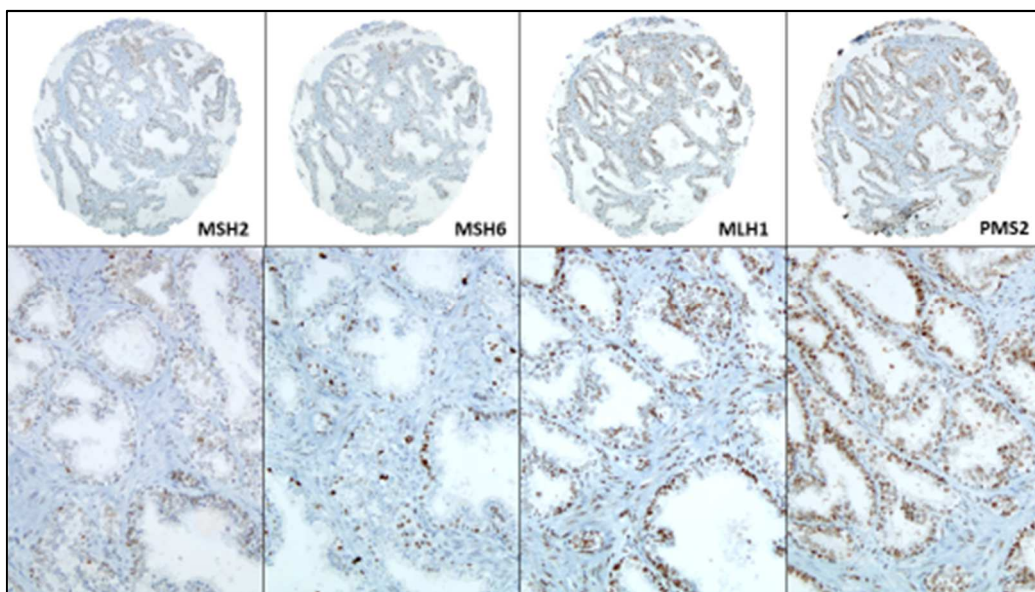


Figura 12: Imatges representatives de la immunotinció de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 a l'epiteli prostàtic benigne (x40 – fila superior- i x150 – fila inferior-).

Per al propòsit d'aquest estudi, l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 es va considerar negativa en aquells casos pertanyents al Grup 0 (Histoscore = 0 – 10). La resta d'intensitats (Grup 1) van ser considerades com a casos positius. Es va ser molt estricte alhora de considerar la presència d'una pèrdua d'expressió significativa funcionalment i no atribuïble a variacions tècniques o de fixació, considerant un marge mínim molt restrictiu per tal d'identificar els casos negatius (Histoscore = 0 – 10).

La distribució dels casos segons els grups Histoscore va ser la següent: MSH2 (grup 0 = 16, grup 1 = 184), MSH6 (grup 0 = 113, grup 1 = 82, NV = 5), MLH1 (grup 0 = 10, grup 1 = 190) i PMS2 (grup 0 = 4, grup 1 = 196). De forma general, la pèrdua d'expressió proteica a nivell nuclear es va documentar en un 8% (16/200) per MSH2, un 5% (10/200) per MLH1, i només en un 2% (4/200) per PMS2. Tres d'aquests quatre casos (75%) amb expressió deficient de PMS2 també presentaven pèrdua d'expressió de MLH1, i només un cas va presentar expressió anòmala única de PMS2.

Donades les característiques immunohistoquímiques atípiques de MSH6, proteïna que va ser negativa en un percentatge significatiu dels casos, vam definir els conceptes de “**nivells basals**” de MSH6 per aquells tumors amb una immunohistoquímica negativa (Histoscore = 0 – 10), i “**fenotip de sobreexpressió**” (*overexpression phenotype*) per aquells casos amb una immunohistoquímica positiva (Histoscore > 10). En base a aquesta interpretació, la manca d'expressió nuclear de MSH6 es va evidenciar en un 57,9% (113/195) dels casos i la seva sobreexpressió en un 42,1% (82/195). Aquests resultats queden recollits a la **taula 6**.

Alteracions de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN	Freqüència (n) (%)
Pèrdua de MSH2	16/200 (8)
Nivells basals de MSH6	113/195 (57,9)
Pèrdua de MLH1	10/200 (5)
Pèrdua de PMS2	4/200 (2)

Taula 6: Freqüència de les diferents variables immunohistoquímiques analitzades. Els resultats s'expressen com a nombre de casos amb pèrdua d'expressió proteica respecte del total de 200 casos (195 en el cas de MSH6) i com a percentatge.

Com ja s'ha comentat prèviament a l'apartat de material i mètodes, per a la valoració de la immunotinció d'ERG es van considerar dos patrons d'expressió: tinció nuclear negativa o positiva. Per l'anàlisi de PTEN, es van considerar pèrdua (total o parcial) o expressió homogènia. La sobreexpressió d'ERG va ser detectada en un 48% (96/200) dels casos, en tant que la pèrdua d'expressió de PTEN es va observar en un 36,5% (73/200) dels casos.

4. 4. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, ERG i PTEN i la variable "grup de grau" (OMS 2016) en càncer de pròstata

La distribució de les alteracions en l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, ERG i PTEN segons la classificació actual dels GG pronòstics (OMS 2016) es mostra a la **taula 7**.

Agrupant les diferents categories de la variable GG, la sobreexpressió d'ERG es va detectar en un 43,6% (17/39) dels tumors GG1, 48,2% (68/141) dels GG2-4, i 55% (11/20) dels GG5 (Chi-Square test, $p = 0.705$). D'altra banda, el percentatge de casos amb pèrdua d'expressió de PTEN va ser del 20,5% (8/39) als tumors GG1, 37,6% (53/141) als GG2-4, i 60% (12/20) als GG5 (**Chi-Square test, $p = 0.01$**) (**Taula 8**). Així, la sobreexpressió d'ERG no va mostrar relació amb la classificació tumoral segons la variable pronòstica GG, mentre que la pèrdua d'expressió de PTEN va ser estadísticament més freqüent als tumors d'alt grau.

Alteracions de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN, ERG i PTEN segons els GG pronòstics (OMS 2016)						
Tipus d'alteració	Tumors GG1	Tumors GG2	Tumors GG3	Tumors GG4	Tumors GG5	P-value
Pèrdua d'expressió de MSH2	2 (5,1%)	8 (10,1%)	3 (10,3%)	2 (6,1%)	1 (5%)	0.877
Sobreexpressió de MSH6	15 (41,7%)	30 (39%)	12 (41,4%)	12 (36,4%)	13 (65%)	0.280
Pèrdua d'expressió de MLH1	3 (7,7%)	4 (5,1%)	2 (6,9%)	1 (3%)	0 (0%)	0.780
Pèrdua d'expressió de PMS2	0 (0%)	3 (3,80%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0.746
Sobreexpressió d'ERG	17 (43,6%)	36 (45,6%)	16 (55,2%)	16 (48,5%)	11 (55%)	0.776
Pèrdua de PTEN	8 (20,5%)	29 (36,7%)	11 (37,9%)	13 (39,4%)	12 (60%)	0.056

Taula 7: Prevalença de les alteracions de l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN, ERG i PTEN en càncer de pròstata segons la classificació GG (OMS 2016).

Alteracions de l'expressió immunohistoquímica d'ERG i PTEN segons els GG pronòstics (OMS 2016) agrupats en tres clústers				
Tipus d'alteració	Tumors GG1	Tumors GG2-4	Tumors GG5	P-value
Sobreexpressió d'ERG	17 (43,6%)	68 (48,2%)	11 (55%)	0.705
Pèrdua de PTEN	8 (20,5%)	53 (37,6%)	12 (60%)	0.01

Taula 8: Prevalença de les alteracions de l'expressió de les proteïnes ERG i PTEN en càncer de pròstata segons la classificació GG (OMS 2016) agrupats en tres clústers (GG1, GG2-4 vs GG5).

La pèrdua d'expressió proteica a nivell nuclear de **MSH2** es va observar en un 5,1% (2/39) dels tumors GG1, 10,1% (8/79) dels GG2, 10,3% (3/29) dels GG3, 6,1% (2/33) dels GG4 i en un 5% (1/20) dels GG5 (MSH2, Fisher's exact test, $p = 0.877$).

El percentatge de casos amb sobreexpressió nuclear de la proteïna **MSH6** va ser de 41,7% (15/36) en el GG1; 39% (30/77) en el GG2; 41,4% (12/29) en el GG3; 36,4% (12/33) en el GG4 i 65% (13/20) en el GG5 (MSH6, Pearson Chi-Square, $p = 0.280$). Contràriament, el percentatge de casos amb una immunohistoquímica negativa de MSH6 (casos amb nivells basals normals) va ser de 58,3% (21/36) en el GG1, 61% (47/77) en el GG2, 58,6% (17/29) en el GG3, 63,6% (21/33) en el GG4 i 35% (7/20) en el GG5.

La pèrdua d'expressió nuclear de **MLH1** es va evidenciar en 7,7% (3/39) dels tumors GG1, 5,1% (4/79) dels GG2, 6,9% (2/29) dels GG3, 3% (1/33) dels GG4 i en un 0% (0/20) dels GG5 (MLH1, Fisher's exact test, $p = 0.780$).

Finalment, no es va detectar pèrdua d'expressió nuclear de **PMS2** en cap tumor corresponent dels grups GG1, GG3 i GG5, però sí en un 3,8% (3/79) dels tumors del grup GG2 i en un 3% (1/79) del GG4 (PMS2, Fisher's exact test, $p = 0.746$).

La distribució dels percentatges de tumors amb pèrdua d'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN, segons les categories dels GG pronòstics, va ser en general relativament homogènia, sense detectar-se diferències estadísticament significatives amb cap proteïna.

Exemples representatius de les alteracions en l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 es mostren a les **figures 13a-b**.

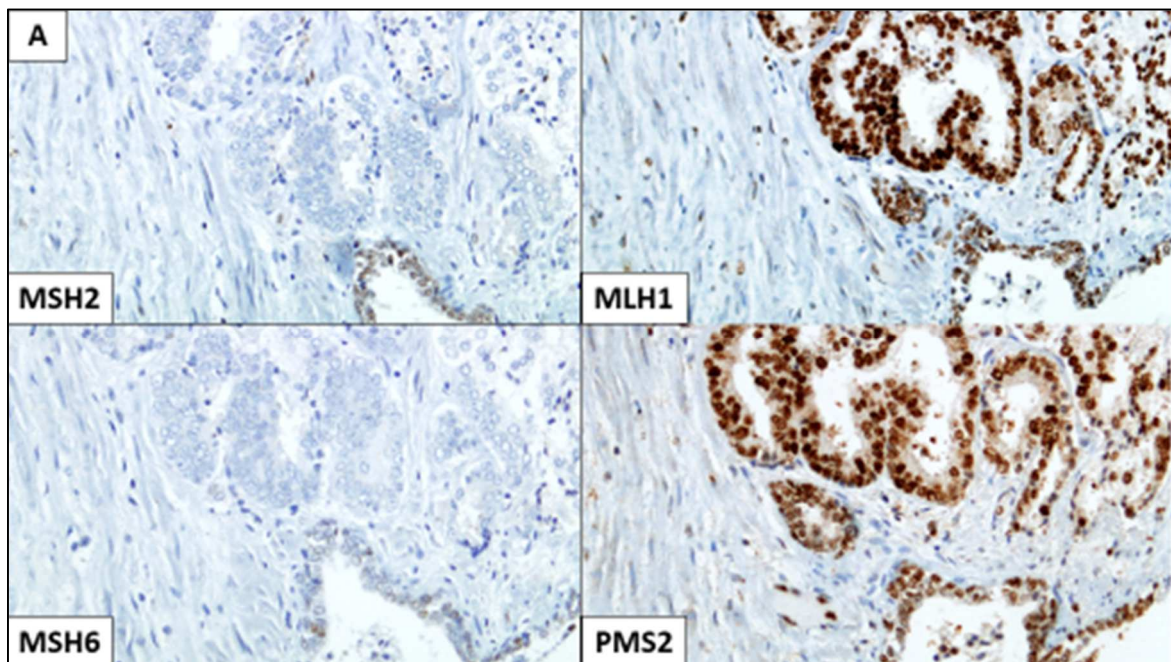
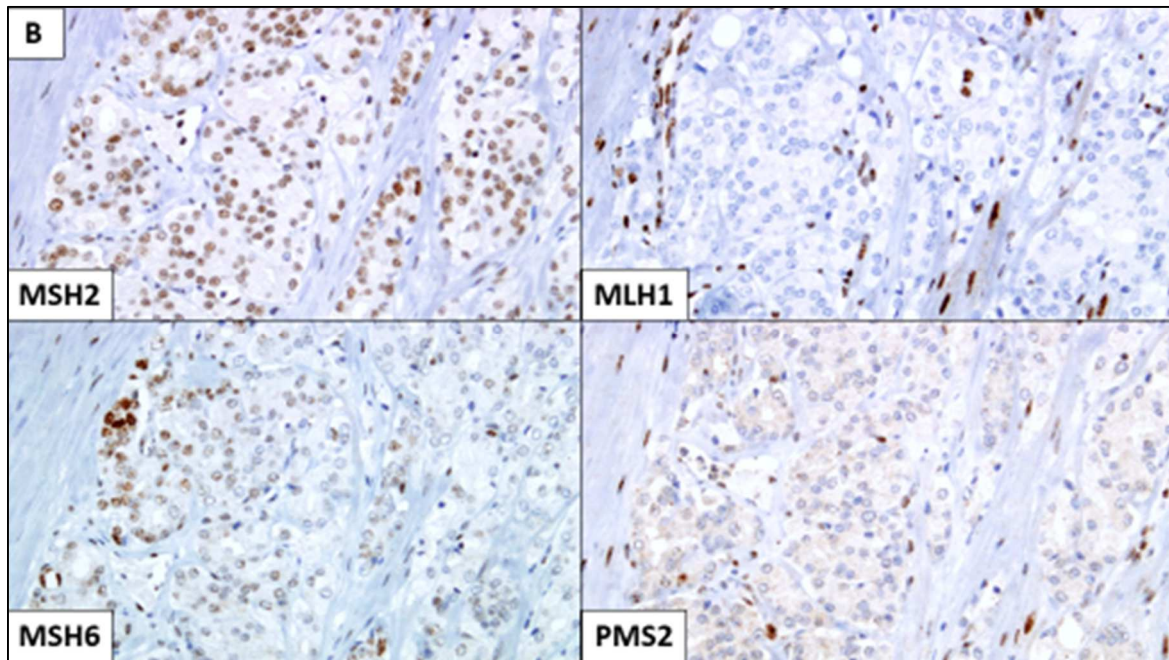


Figura 13. Exemples d'immunotincions de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 en càncer de pròstata (x200). (a) Cas 1: Pèrdua d'expressió immunohistoquímica de MSH2 i nivells basals de MSH6 en un tumor GG4 (GS = 4 + 4), amb expressió preservada de MLH1 i PMS2.



(b) Cas 2: Pèrdua d'expressió immunohistoquímica de MLH1 i PMS2 en un tumor GG4 (GS = 4 +4), amb expressió preservada de MSH2 i MSH6. Limfòcits i cèl·lules estromals usades com a control intern.

4. 4. 1. Expressió de la proteïna MSH6 segons la variable “grup de grau” agrupada en clústers

Les dades d'expressió de MSH6 revelen uns percentatges de sobreexpressió proteica molt semblants entre els GG1-GG4 (GG1: 41,7%, GG2: 39%, GG3: 41,4% i GG4: 36,4%) amb una mitja de 39,4%, i molt diferents dels del grup GG5 (65%). Per aquesta raó, vam realitzar una anàlisi de les dades agrupant els GG en dos clústers: GG1-4 *vs* GG5 (**Taula 9**).

En base a aquesta anàlisi, considerant únicament aquestes dues categories GG1-4 i GG5, la sobreexpressió de MSH6 presentava una associació estadísticament significativa amb els tumors GG5 (**Pearson Chi-Square, $p = 0.028$**), és a dir, els casos tumorals amb un GS més elevat, i, per tant, amb una major agressivitat i un major dany genòmic.

Expressió de la proteïna MSH6 segons els GG (OMS 2016) agrupats en dos clústers			
Tipus d'alteració	Tumors GG1-4	Tumors GG5	P-value
Expressió basal de MSH6	106 (60,57%)	7 (35%)	0.028
Sobreexpressió de MSH6	69 (39,43%)	13 (65%)	

Taula 9: Expressió nuclear basal i sobreexpressió de la proteïna MSH6 segons els GG agrupats en dos clústers (GG1-4 vs GG5).

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'expressió de la proteïna MSH6 va ser negativa en un percentatge important dels casos (GG1-4: 60,57%; GG5: 35%), fet que podria indicar un significat biològic i clínic diferent d'aquesta proteïna, si més no en el CaPr en comparació amb els patrons més comuns d'expressió de MSH2, MLH1 i PMS2. Per aquesta raó, vam definir els conceptes “nivells basals” i “sobreexpressió”, interpretant com a nivells basals els casos amb immunohistoquímica negativa i com a sobreexpressió amb finalitat reparadora davant del dany genòmic, aquells casos amb positivitat immunohistoquímica, hipotetitzant que la proteïna MSH6 se sobreexpressa amb major freqüència en els casos més agressius amb un major GG.

4. 4. 2. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i la variable “grup de grau” en càncer de pròstata

També es va analitzar la doble pèrdua d'expressió de les proteïnes dominants de cadascun dels respectius heterodímers (MSH2 i MLH1), així com la pèrdua d'una de les dues (MSH2 o MLH1), en relació amb la variable GG.

La distribució de pèrdua d'expressió entre els diferents GG va ser novament força homogènia. La pèrdua d'expressió de MSH2 o MLH1 es va observar en un 2,6% dels tumors GG1; 10,1% dels GG2; 10,3% dels GG3; 9,1% dels GG4, i 5% dels GG5. En canvi, la doble pèrdua proteica (MSH2 + MLH1) va ser un esdeveniment infreqüent i únicament es va reportar en un 5,1% dels casos GG1; un 2,5% dels GG2; un 3,4% dels GG3, i en cap tumor dels grups GG4 i GG5.

Ni la pèrdua d'expressió aïllada de MSH2 o MLH1, ni la pèrdua d'expressió combinada d'ambdues proteïnes va mostrar una tendència estadísticament significativa amb la variable GG (Fisher's exact test, $p = 0.787$).

4. 5. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1 i l'estatus d'ERG en càncer de pròstata

Amb l'objectiu d'analitzar la relació potencial entre l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 amb la via d'activació del gen *ERG*, els casos estudiats es van dividir en dos grups depenent dels resultats obtinguts a partir de l'estudi immunohistoquímic de la proteïna ERG: tumors ERG-positius ($n = 96$), majoritàriament deguts al reordenament del gen *ERG* (**Figura 14**), i tumors ERG-negatius (casos *wt*) ($n = 104$). No es va analitzar la relació entre la proteïna PMS2 i l'estatus d'ERG, perquè la pèrdua de PMS2 es va considerar com un event molt infreqüent.

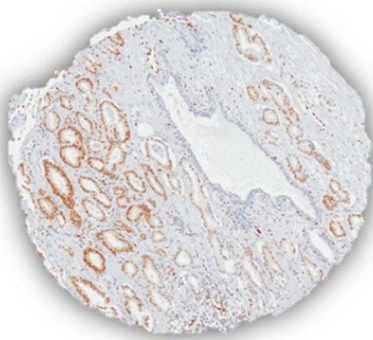


Figura 14. Exemple d'immunotinció positiva de la proteïna ERG (x50) en un cas amb un GS = 3 + 3 (GG1).

Respecte a la proteïna **MSH2**, la seva pèrdua d'expressió va mostrar una associació estadísticament significativa amb els tumors ERG-negatius (casos *wt*) (**Pearson Chi-Square, $p = 0.015$**), és a dir, amb absència del gen de fusió *ERG*. Concretament, un 81,2% (13/16) dels casos MSH2-negatius eren ERG-*wt*, en tant que en els tumors MSH2-*wt*, els percentatges de positivitat i de negativitat d'ERG van ser respectivament del 50,3% (93/185) i del 49,7% (92/185).

Pel que fa a la proteïna **MSH6**, les alteracions de la seva expressió no van mostrar una associació significativa amb l'estatus d'ERG. En el grup de tumors ERG-positius, un 54,9% (45/82) va mostrar sobreexpressió de MSH6, i en el grup de tumors ERG-*wt*, el percentatge de sobreexpressió de MSH6 va ser del 45,1% (37/82) (Pearson Chi-Square, $p = 0.112$).

Finalment, respecte a la proteïna **MLH1**, la pèrdua d'expressió va ser un event molt més freqüent al grup de tumors ERG-*wt* amb un percentatge del 70% (7/10), en comparació amb el grup de tumors ERG-positius (30%, 3/10) (Fisher's exact test, $p = 0.335$). Tanmateix, aquesta diferència no va ser estadísticament significativa (**Taula 10**).

Alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus d'ERG				
Tipus d'alteració	Total de tumors	Tumors ERG-positius	Tumors ERG-negatius (<i>wt</i>)	P-value
Pèrdua de MSH2	16	3 (18,8%)	13 (81,2%)	0.015
Sobreexpressió de MSH6	82	45 (54,9%)	37 (45,1%)	0.112
Pèrdua de MLH1	10	3 (30%)	7 (70%)	0.335
Pèrdua de MSH2 i/o MLH1	21	5 (23,8%)	16 (76,2%)	0.019

Taula 10: Relació entre les alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus d'ERG.

4. 5. 1. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i l'estatus d'ERG

La pèrdua d'expressió combinada de les proteïnes MSH2 i MLH1 o la pèrdua de com a mínim una d'elles (MSH2 i/o MLH1) va mostrar una associació estadísticament significativa amb els tumors ERG-*wt* (**Pearson Chi-Square, $p = 0.019$**). El percentatge de tumors amb pèrdua de MSH2 i/o MLH1 en els quals la proteïna ERG va ser negativa va ser del 76,2% (16/21), en comparació amb el 23,8% (5/21) dels tumors ERG-positius (**Taula 10**).

4. 6. Relació entre l'expressió proteica de MSH2, MSH6, MLH1 i l'estatus de PTEN en càncer de pròstata

La relació potencial entre l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 i la inactivació del gen *PTEN* també va ser analitzada. Seguint el mateix procediment que a l'apartat 4. 5., els casos estudiats es van dividir en dues categories segons els resultats obtinguts mitjançant l'estudi de l'expressió immunohistoquímica de la proteïna PTEN: tumors PTEN-positius

(casos *wt*) (n = 127), i tumors PTEN-negatius (total o parcial), és a dir, amb inactivació del gen (n = 73) (**Figures 15a-b**). Novament, no es va analitzar la relació entre la proteïna PMS2 i l'estatus de PTEN, per considerar-se la pèrdua de PMS2 com un event molt poc freqüent (2%).

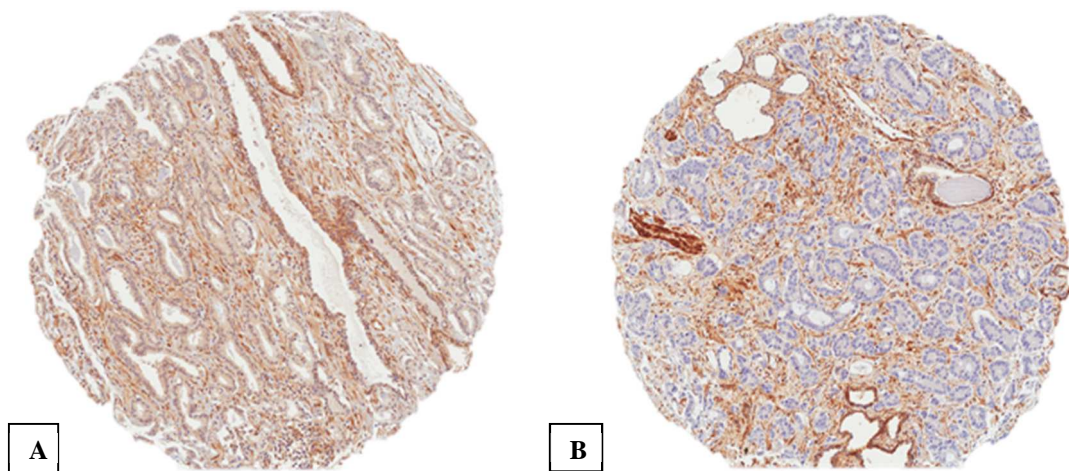


Figura 15. Exemples d'immunotincions de la proteïna PTEN (x50) en càncer de pròstata. **(A)** Cas 1: Expressió normal, totalment positiva de la proteïna PTEN en un tumor amb un GS = 6 (GG1). **(B)** Cas 2: Pèrdua marcada d'expressió immunohistoquímica de PTEN en un tumor GG5 (GS > 8).

Respecte la proteïna **MSH2**, el percentatge de pèrdua va ser igual, tant en el grup de tumors amb pèrdua de PTEN (50%, 8/16) com en el grup de tumors amb preservació de PTEN (*wt*) (50%, 8/16) (Pearson Chi-Square, $p = 0.242$). Pel que fa als tumors amb pèrdua de **MLH1**, el percentatge de pèrdua de PTEN només va ser del 30% (3/10), mentre que el 70% (7/10) van ser PTEN-positius (Pearson Chi-Square, $p = 0.749$). Pel que fa als tumors amb sobreexpressió de **MSH6**, el percentatge de pèrdua de PTEN va ser del 35,4% (29/82), mentre que el 64,6% (53/82) van ser PTEN-positius (Pearson Chi-Square, $p = 0.896$) (**Taula 11**). Per tant, l'absència d'expressió de MSH2 i MLH1 i la sobreexpressió de MSH6 no van mostrar cap relació estadísticament significativa amb l'estatus de PTEN.

Alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus de PTEN				
Tipus d'alteració	Total de tumors	Tumors PTEN-positius (<i>wt</i>)	Tumors PTEN-negatius	P-value
Pèrdua de MSH2	16	8 (50%)	8 (50%)	0.242
Sobreexpressió de MSH6	82	53 (64,6%)	29 (35,4%)	0.896
Pèrdua de MLH1	10	7 (70%)	3 (30%)	0.749
Pèrdua de MSH2 i/o MLH1	21	12 (57,1%)	9 (42,9%)	0.522

Taula 11: Relació entre les alteracions úniques i combinades de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1 segons l'estatus de PTEN.

4. 6. 1. Relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i l'estatus de PTEN

Tampoc la pèrdua d'expressió combinada de les proteïnes MSH2 i MLH1 o la pèrdua de com a mínim una d'elles (MSH2 i/o MLH1) va mostrar una associació amb els tumors PTEN-negatius (Pearson Chi-Square, $p = 0.522$). El percentatge de tumors amb pèrdua de MSH2 i/o MLH1 en els quals la proteïna PTEN va ser positiva (PTEN *wt*) va ser del 57,1% (12/21), en comparació amb el 42,9% (9/21) dels tumors PTEN-negatius (**Taula 11**).

5. DISCUSSIÓ

El CaPr constitueix el segon càncer més freqüent en homes a Occident i la quarta neoplàsia maligna més comuna arreu del món [204]. La majoria d'aquests càncers presenten un comportament indolent, malgrat un petit subgrup que es caracteritza per tenir un curs clínic més agressiu, requerint d'un tractament radical i exhaustiu [205]. Respecte al pronòstic, els paràmetres més ben establerts són les determinacions sèriques de PSA, la càrrega tumoral histològica, el GS i la classificació dels GG (OMS 2016) [40], així com l'estadiatge clínico-patològic (classificació TNM de l'AJCC, 8th Edition, 2017). Malgrat que aquestes dades són molt valuoses pel que fa al diagnòstic i pronòstic del CaPr, en el context actual de la medicina personalitzada, existeix una necessitat imperiosa de disposar de dades moleculars més específiques per tal d'optimitzar i individualitzar les decisions terapèutiques. En aquest sentit, un millor coneixement de la biologia del CaPr podria facilitar la identificació de biomarcadors moleculars, el seu rol en la carcinogènesi prostàtica i la seva aplicabilitat a la pràctica clínica. Es per això, que el principal objectiu del present estudi ha estat analitzar l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) i les seves alteracions en una sèrie de casos de CaPr per tal de caracteritzar morfològicament un subgrup d'ADCs prostàtics associats a inestabilitat de microsatèl·lits, així com investigar com es relacionen aquestes alteracions amb les característiques clínico-patològiques dels pacients i l'estatus d'ERG i PTEN per tal d'inferir si es tracta d'events que formin part d'una mateixa via carcinogenètica.

Els estudis de seqüenciació massiva han possibilitat la detecció d'alteracions genètiques específiques potencialment tributàries de tractaments diana (*molecular targeted therapy*) en un important nombre de càncers humans. Per exemple, la presència de mutacions d'*EGFR* en un subgrup d'ADCs pulmonars constitueix una diana terapèutica a nivell molecular per al tractament amb inhibidors dels receptors de les tirosina-quinases [205]. En aquest sentit, són nombrosos els estudis que han descrit les principals alteracions moleculars que es coneixen actualment, subjacents a l'origen i progressió del CaPr [77-83, 87, 90]. De fet, a l'actualitat el The Cancer Genome Atlas (TCGA), un projecte iniciat conjuntament entre el National Cancer Institute (NCI) i el National Human Genome Research Institute (NHGRI) amb l'objectiu d'elaborar un atlas amb les principals alteracions moleculars subjacents als diferents tipus de càncer, ha analitzat molecularment un total de 333 casos de CaPr primari. Es tracta d'un estudi especialment rellevant en aquest camp publicat per TCGA al 2015 [83], una de les principals aportacions del qual ha estat la identificació de l'heterogeneïtat tumoral

subjacent en CaPr i l'existència de diferents subtipus moleculars definits específicament per fusions o reordenaments genètics específics (*ERG*, *ETV1/4* i *FLII*) o mutacions somàtiques (*SPOP*, *FOXA1*). En aquest treball es va posar de manifest una taxonomia molecular molt rica del CaPr, en la qual un 74% dels tumors prostàtics analitzats es podien classificar en un dels set subgrups moleculars definits per la presència de fusions en el gens de la família *ETS* o mutacions somàtiques en gens com *SPOP*, *FOXA1* o *IDH1*. Així mateix, els resultats d'aquest estudi van mostrar que aproximadament el 20% dels CaPr primaris presenten defectes genòmics implicats en les vies reparadores de l'ADN i altres vies carcinogenètiques clàssiques com la de *PI3K-AKT* i la de *RAS-MAPK*, posant-se de manifest l'existència d'oportunitats potencials en quant al tractament amb teràpies dirigides.

5.1. Càncer de pròstata i expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2

Com s'ha explicat en apartats anteriors (veure apartat 1. 8. 5. Gens reparadors de l'ADN), el sistema de reparació d'errors de l'emparellament de l'ADN és un mecanisme d'excisió-resíntesi que actua com un sensor del dany genòmic, corregint errors generats durant la replicació de l'ADN. Està constituït principalment pels complexos homòlegs hMutS i hMutL, que actuen formant heterodímers amb funcions específiques. A l'actualitat, els complexos més ben caracteritzats són hMutS α i hMutL α , formats respectivament pels gens *MSH2* i *MSH6*, i *MLH1* i *PMS2* [160-163]. Els defectes en les proteïnes codificades per aquests gens tenen com a conseqüència l'acumulació d'alteracions als microsatèl·lits, podent donar lloc a IMS i a un estatus d'hipermutació [164]. El rol dels gens reparadors de l'ADN ha estat extensament estudiat en càncers com el de colon i el d'endometri. El TCGA va reportar que fins a un 16% dels tumors de colon i un 35% dels tumors d'endometri presentaven un fenotip hipermutat [166,167]. Per ambdós tipus de càncer, un subgrup considerable de neoplàsies hipermutades estaven associades a IMS, més freqüentment degut al silenciament epigenètic del gen *MLH1* [166,167]. Tanmateix, pel que fa al desenvolupament i progressió del CaPr, existeix certa controvèrsia sobre el paper d'aquests gens, ja que les alteracions genètiques subjacents que condicionen IMS estan poc definides en aquest tipus de càncer. Malgrat l'existència d'alguns estudis previs que reporten alteracions en l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN, tant en CaPr primari com avançat [171-175], són molt poques les mutacions que han estat identificades en aquests gens. Alguns autors com Pritchard *et al.* [164], han especulat que les limitacions tècniques

poden haver comportat una infraestimació de les mutacions detectades en aquests gens en CaPr. Així, tant els mecanismes subjacents condicionants d'aquestes deficiències, com el seu significat clínic-patològic i la seva possible repercussió terapèutica, romanen per aclarir i mereixen més esforços en quant a investigació.

Les metodologies realitzades a gran escala com, per exemple, les anàlisis mitjançant Next-Generation Sequencing (NGS) o les anàlisis d'expressió gènica amb micromatrius, tot i que es van implantant paulatinament als departaments de patologia, a dia d'avui encara no constitueixen una eina totalment accessible per a classificar els pacients amb CaPr en la pràctica clínica diària. A més, aquests tipus de procediments presenten certes limitacions, com la necessitat de disposar de teixit tumoral en fresc viable. Aquest representa actualment un dels principals inconvenients quan parlem de mostres de CaPr, especialment quan es tracta de tumors prostàtics agressius, ja que les mostres dels casos de major grau histològic són biòpsies d'agulla que difícilment poden ser usades per a TMA's. És per aquesta raó que molts grups de treball han aplicat altres metodologies com l'ús de panells de marcadors immunohistoquímics. La IHQ constitueix una tècnica disponible pràcticament en la totalitat dels serveis de patologia, sent econòmica, aplicable a mostres processades en parafina i en la qual els patòlegs tenim molta experiència en quant a la seva interpretació.

En aquesta línia, en el present estudi hem avaluat l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 en una cohort de tumors prostàtics mitjançant IHQ, que constitueix el mètode de cribratge més usat per detectar les alteracions en l'expressió d'aquestes proteïnes.

En base a la literatura actual revisada, el present treball representa el primer estudi que analitza l'expressió d'aquestes proteïnes reparadores de l'ADN i la distribució de les seves alteracions segons la classificació dels GG, el sistema complementari al GS proposat per la OMS al 2016 per gradar el CaPr [41]. A més a més, es tracta d'un dels primers treballs en analitzar la relació potencial entre l'expressió d'aquestes proteïnes i l'estatus d'ERG i PTEN.

L'anàlisi immunohistoquímic es va realitzar en 200 tumors de pròstata agrupats en 9 TMA's, que contenien un total de 672 *cores*. Es van obviar 28 casos considerats com a no valorables bàsicament per les característiques no adequades en quant a la preservació del teixit tumoral.

La metodologia aplicada va ser similar a la del treball publicat per Wilczak *et al.* [175], en què es va analitzar un panell de marcadors immunohistoquímics basat en MSH6, MLH1, PMS2 i ERG en espècimens de CaPr.

Al nostre estudi, els marcadors immunohistoquímics analitzats (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, ERG i PTEN) van ser valorats conjuntament per dos patòlegs com a mínim, per tal de disminuir el grau de subjectivitat en quant a la interpretació i quantificació, especialment en aquells casos en què es va generar discordança, i es va consensuar finalment una única puntuació. Es va analitzar l'expressió proteica a la població tumoral, obviant-se qualsevol altre positivitat corresponent a un altre tipus cel·lular, com, per exemple, les cèl·lules inflamatòries o endotelials, que a la vegada constitueixen un bon control positiu de la tècnica. La interpretació va ser realitzada en equip en un microscopi multicapçal, realitzant-se una estimació visual del percentatge de cel·lularitat positiva i negativa i de la intensitat de la tinció. No es van utilitzar sistemes de digitalització d'imatge per a anàlisis automatitzades.

Per a la valoració de la immunotinció de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 es va quantificar la intensitat de la tinció nuclear. En general, la interpretació i quantificació de la tinció immunohistoquímica amb marcadors nuclears presenta una menor complexitat i subjectivitat i més reproductibilitat que la tinció amb marcadors citoplasmàtics. En ocasions, la mala delimitació citoplasmàtica de la cèl·lula tumoral pot dificultar la seva individualització i suposar una limitació alhora de quantificar el percentatge de cel·lularitat positiva o negativa per un determinat marcador immunohistoquímic. Per aquest motiu, es va intentar reduir el nombre de marcadors immunohistoquímics emprats amb tinció citoplasmàtica.

La interpretació de la tinció immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 va estar basada en estudis previs com el de Shia *et al.* [203] i Overbeek *et al.* [207]. Donada l'escassa literatura publicada respecte la valoració immunohistoquímica d'aquests marcadors en CaPr, el treball de Shia *et al.* del 2005 [203] va representar un bon model a aplicar a la nostre cohort, malgrat haver estat realitzat en casos de càncer colorectal. En aquest context, vam considerar com a expressió constitutiva l'expressió nuclear, i es va comptabilitzar com a positiu qualsevol cas que mostrés tinció nuclear, encara que fos focal o dèbil. L'esdeveniment a detectar va ser la pèrdua d'expressió, que havia de ser completa. La tinció citoplasmàtica va ser considerada com aberrant, i malgrat comptabilitzar-se a la taula de

resultats de l'estudi, finalment no va ser valorada a l'anàlisi de resultats. Els controls interns utilitzats van ser les cèl·lules inflammatòries, estromals i endotelials.

Per tal de quantificar la intensitat nuclear, es va considerar que la millor metodologia era aplicar el mètode de quantificació per Histoscore, que ja ha estat utilitzat en altres estudis publicats pel nostre grup de recerca [108]. Per consultar la fórmula aplicada, els punts de tall i els grups Histoscore realitzats, veure Materials i mètodes (apartat 3. 3. 3. Lectura immunohistoquímica de les matrius tissulars).

Els resultats obtinguts a la nostre cohort van mostrar una freqüència general baixa pel que fa a la pèrdua d'expressió proteica de MSH2, MLH1 i PMS2. Concretament, la pèrdua d'expressió a nivell nuclear es va documentar en un 8% per MSH2, un 5% per MLH1, i un 2% per PMS2 (veure apartat 4. 3., resultats recollits a la taula 6). Aquests resultats serien concordants amb estudis previs publicats [165,169,172,175] com el de Wilczak *et al.* [175], que recentment van reportar la pèrdua d'expressió nuclear de MSH6 en un 10,5% dels casos analitzats, de MLH1 en un 14,5% i de PMS2 en un 15%. Burger *et al.* [172] també van analitzar immunohistoquímicament l'expressió de les proteïnes MSH2 i MLH1, observant una pèrdua d'expressió de MSH2 del 12% i sense detectar cap cas amb pèrdua completa d'expressió de MLH1. També recentment, Guedes *et al.* [169] van publicar un estudi sobre el rol de la pèrdua de MSH2 en CaPr, en el qual es va detectar pèrdua d'aquesta proteïna en un 1,2% dels casos, la majoria d'ells corresponents a ADCs primaris prostàtics (1.133 casos) i carcinomes prostàtics neuroendocrins de cèl·lula petita (43 casos). Aquest darrer estudi documenta que la pèrdua immunohistoquímica de MSH2 està fortament relacionada amb la inactivació i hipermutació del gen *MSH2* i que aquest fet sembla ser més freqüent en casos de CaPr d'alt grau.

En relació amb aquest estudi, prèviament al 2014 Pritchard *et al.* [164] van descriure un subtipus hipermutat de CaPr avançat associat principalment a mutacions als gens *MSH2* i *MSH6* ocasionants d'una pèrdua de funció, en què 4 de 7 casos analitzats de forma immunohistoquímica i posteriorment mitjançant tècniques moleculars, mostraven reordenaments estructurals complexos en *MSH2* i *MSH6*.

Respecte a l'anàlisi d'expressió de la proteïna MSH6 realitzat al nostre estudi, són diverses les consideracions a tenir en compte. En primer lloc, es va analitzar la seva expressió en un total de 195 casos, sent negativa en un percentatge considerable d'aquests (57,9%) (veure apartat 4. 3., resultats recollits a la taula 6). Davant d'aquestes característiques

immunohistoquímiques clarament diferents de MSH6 respecte de la resta de les proteïnes analitzades, una de les consideracions que vam valorar va ser la definició dels conceptes de “nivells basals normals” i “fenotip de sobreexpressió”, aplicades respectivament per aquells tumors amb una IHQ negativa i per aquells amb una IHQ positiva. En base a aquestes consideracions, els nostres resultats mostraven que un total de 42,1% dels tumors prostàtics analitzats presentaven sobreexpressió de MSH6.

Tot i l'escassa literatura al respecte en l'àmbit del CaPr, la sobreexpressió de proteïnes reparadores de l'ADN com MSH2 i MLH1 ja ha estat prèviament descrita en altres tipus de càncer com, per exemple, el càncer gàstric [179] o el càncer de pulmó de cèl·lula no petita, camp en el qual existeixen estudis com el de Li *et al.* [178] en què es va reportar que la sobreexpressió de hMLH1 correlacionava amb una major freqüència de mutacions d'*EGFR* als exons 19 i 21, postulant que podria tractar-se d'un nou marcador molecular predictor de resposta al tractament amb inhibidors dels receptors de les tirosina-quinases en càncer de pulmó de cèl·lula no petita. Aquesta sobreexpressió també ha estat descrita en tumors cerebrals astrocitaris malignes. Srivastava *et al.* [180] van reportar una expressió significativament més alta de hMSH2 en glioblastomes (grau IV, OMS 2016) respecte d'astrocitomes (graus I-III, OMS 2016).

Seguint amb un dels objectius del present estudi, es va explorar la relació entre l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 i la variable GG. La distribució dels percentatges de tumors amb pèrdua d'expressió de MSH2, MLH1 i PMS2 entre els diferents GG va ser relativament homogènia. No es van detectar diferències estadísticament significatives (veure apartat 4. 4., resultats recollits a la taula 7).

Pel que fa a la proteïna MSH6, com els percentatges de sobreexpressió proteica obtinguts van ser molt semblants entre els GG1, GG2, GG3 i GG4 a diferència del GG5, també vam realitzar una anàlisi de les dades agrupant els GG en dos clústers: GG1-4 vs GG5. Els nivells interpretats com a sobreexpressió de MSH6 es van reportar en un 39,4% dels tumors agrupats en GG1-4 i en un 65% dels casos GG5 (veure apartat 4. 4. 1., resultats recollits a la taula 9). Al realitzar aquestes dues agrupacions, vam observar una relació estadísticament significativa entre la sobreexpressió de MSH6 i els tumors del GG5 (**Pearson Chi-Square, $p = 0.0281$**), és a dir, els casos tumorals més agressius amb un GS més elevat. Davant d'aquests resultats i de la consideració prèvia dels conceptes de “nivells basals normals” i de “sobreexpressió” reparadora davant del dany genòmic, la principal hipòtesi que tenim

sobre aquest aspecte és que la proteïna MSH6 se sobreexpressaria amb major freqüència en els casos més agressius i amb un major GG. Tenint en compte que la majoria de cèl·lules tumorals es troben contínuament en procés de replicació, fase durant la qual sovint es produeixen defectes en l'emparellament de bases de l'ADN i que, per tant, requereix d'una major eficiència del sistema reparador d'errors de l'ADN, els nostres resultats suggereixen que MSH6 podria tractar-se d'un marcador d'agressivitat i de dany genòmic en CaPr. No obstant això, els mecanismes moleculars que controlen l'expressió variable de MSH6 constitueix un tema que requereix d'estudis addicionals.

A diferència de treballs com el de Guedes *et al.* [169] que defensa que la pèrdua immunohistoquímica d'algunes d'aquestes proteïnes com MSH2 és un fet que sembla ser més freqüent en CaPr d'alt grau, la nostra hipòtesi sobre la sobreexpressió de MSH6 estaria en concordança amb alguns estudis previs que suggereixen que el dany genòmic podria activar la sobrerregulació dels gens reparadors de l'ADN, i que relacionen la sobreexpressió de les proteïnes codificades per aquests gens amb una major agressivitat tumoral i un pitjor pronòstic [171-175]. Al 2017, Wilczak i col·laboradors [175] van publicar que la sobreexpressió dels gens reparadors de l'ADN (MSH6, MLH1 i PMS2) és un tret freqüent al CaPr, relacionant-la amb inestabilitat genètica, agressivitat tumoral i un pitjor pronòstic de la malaltia (GS elevat, presència de metàstasis ganglionars, estadiatge patològic més avançat i una recurrència bioquímica precoç). Burger *et al.* [172] també van reportar al 2006 que l'expressió moderada/intensa de hMSH2 al CaPr correlacionava amb una recurrència més primerenca de la malaltia i indicava un pronòstic clínic desfavorable. Un any més tard, al 2007 Norris *et al.* [171] van publicar un treball que documentava per primera vegada en humans una elevació significativa de la proteïna PMS2 en teixit prostàtic tumoral en comparació amb el teixit normal adjacent ($p < 0.0001$), inferint així una relació potencial entre la sobreexpressió d'aquests gens i la tumorogènesi del CaPr. Van observar també una expressió immunohistoquímica incrementada de PMS2 en àrees de PIN, semblant a l'evidenciada en les àrees corresponents a CaPr, hipotetitzant que l'elevació de PMS2 podria tractar-se d'un event primerenc en la carcinogènesi prostàtica. Aquest estudi postulava que l'elevació de PMS2 podia constituir un marcador pronòstic en teixit pre-neoplàsic i tumoral, amb independència de l'estatus del gen *MLH1*, el dominant de l'heterodímer; una reflexió

que de forma anàloga es pot aplicar al nostre estudi en el cas de l'heterodímer constituït per MSH6 i MSH2.

Per finalitzar amb aquest apartat, també vam explorar la relació entre l'expressió de les proteïnes dominants de l'heterodímer (MSH2 i MLH1) i la variable GG. Per aquest propòsit, es va analitzar la doble pèrdua d'expressió de MSH2 i MLH1 o la pèrdua d'una de les dues. La distribució tant de l'expressió proteica com de la respectiva pèrdua entre els diferents GG va ser novament força homogènia. Ni la pèrdua d'expressió aïllada de MSH2 o MLH1, ni la pèrdua d'expressió combinada d'ambdues proteïnes va mostrar una tendència estadísticament significativa amb la variable GG.

5. 2. Relació de l'expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 amb l'estatus d'ERG i PTEN

Un altre dels objectius del present treball va ser investigar la relació potencial entre l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN i l'expressió d'ERG i PTEN, dues proteïnes codificades per gens pertanyents a la via de les translocacions de la carcinogènesi prostàtica, per tal de tractar d'inferir si es tracta d'esdeveniments que formin part d'una mateixa via carcinogenètica, tema sobre el qual la literatura actual és molt escassa. Com ja s'ha explicat a la introducció (veure apartat 1. 8. 1.), el gen *ERG* està implicat en la fusió genètica *TMPRSS2-ERG*, coneguda per ser l'alteració genètica més freqüent en CaPr. Aquest gen de fusió està present en aproximadament un 50% dels tumors de pròstata, i actualment defineix el major subgrup molecular en aquestes neoplàsies [78,83,90,117-119]. Com a conseqüència de la fusió, l'expressió de la proteïna d'ERG s'incrementa de forma aberrant.

D'altra banda, la relació entre la pèrdua de PTEN amb els tumors prostàtics d'alt grau ha estat extensament reportada [146,147], de forma que tant els reordenaments d'*ERG* com la pèrdua de *PTEN* són esdeveniments comuns i concomitants en la carcinogènesi prostàtica, que poden cooperar en la progressió tumoral [123,148,149]. La inactivació de *PTEN* ha estat considerada com un esdeveniment tardà en el procés de desenvolupament tumoral, que s'ha relacionat amb fases més avançades de la malaltia [81,84], i com un procés consecutiu a la fusió genètica d'*ERG* [208]. En aquest sentit, estudis previs del nostre grup de recerca van revelar que el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* està associat amb CaPr de baix grau quan aquest

reordenament es presenta com a esdeveniment patològic únic. Un segon reordenament (*SLC45A3-ERG*), així com la pèrdua de *PTEN*, podria conduir de forma potencial a tumors amb un major GS i un estadiatge més avançat [123].

Per a la valoració de la immunotinció de les proteïnes ERG i PTEN ens vam basar en la mateixa metodologia aplicada prèviament a l'estudi que vam publicar al 2017 [124], considerant-se com a expressió constitutiva normal la immunotinció negativa d'ERG i la immunotinció homogènia i intensa de PTEN, respectivament.

D'una banda, per a la interpretació de la tinció immunohistoquímica d'ERG, no es va fer la valoració de la intensitat, perquè tots els casos positius mostraven una alta intensitat. Únicament es van considerar dos patrons d'expressió: tinció nuclear negativa (cap tinció detectable) o positiva (tinció nuclear detectable) i les cèl·lules endotelials es van utilitzar com a control intern positiu. D'altra banda, en el cas de l'anàlisi de PTEN, es va aplicar un sistema d'avaluació semi-quantitatiu, utilitzant les següents variables: pèrdua total d'expressió nuclear i citoplasmàtica = 0, pèrdua parcial d'expressió = 1, i expressió intensa, homogènia = 2. El teixit normal adjacent es va usar com a referència interna.

Contextualitzant-ho amb el present estudi, Wilczak i col·laboradors [175] van publicar al 2017 un article en què descriuen que la sobreexpressió dels gens reparadors de l'ADN (*MSH6*, *MLH1* i *PMS2*) era una troballa freqüent al CaPr, relacionada amb un pitjor pronòstic. Curiosament, l'impacte en quant a pronòstic va ser més consistent en aquells càncers que no mostraven el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* en comparació amb aquells tumors ERG-positius.

Amb l'objectiu d'investigar l'impacte potencial de les alteracions de les proteïnes reparadores de l'ADN amb la via d'ERG, a l'estudi actual es va analitzar la relació entre les alteracions en l'expressió de *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* i *PMS2* amb l'estatus d'ERG i PTEN. Els nostres resultats han demostrat l'existència d'una associació estadísticament significativa entre la pèrdua d'expressió de *MSH2* i els tumors ERG-*wt* ($p = 0.015$). A més a més, la pèrdua d'expressió combinada de les proteïnes *MSH2* i *MLH1*, o la pèrdua única de com a mínim una d'elles també ha mostrat una associació estadísticament significativa amb els tumors ERG-*wt* ($p = 0.019$). Respecte a la proteïna *MSH6*, la seva sobreexpressió no va mostrar cap relació amb l'estatus d'ERG ni de PTEN.

Així doncs, els nostres resultats permeten establir la hipòtesi que els tumors prostàtics amb pèrdua d'expressió de MSH2 o amb deficiència combinada de MSH2 i/o MLH1 podrien evolucionar a partir d'una via de progressió tumoral independent dels reordenaments genètics que impliquin al gen *ERG*. És a dir, els nostres resultats suggereixen un rol potencial d'aquestes proteïnes reparadores de l'ADN en una via carcinogenètica del CaPr alternativa a la de les translocacions. Una possible explicació en aquest aspecte és que, probablement, aquests tumors alberguin una freqüència major de mutacions genètiques esporàdiques i mostrin un major potencial agressiu.

Contràriament, una altra troballa remarcable del nostre estudi ha estat que la pèrdua de PTEN no ha mostrat cap relació estadística amb l'expressió de les proteïnes reparadores de l'ADN. Com s'ha comentat anteriorment, la pèrdua de PTEN s'ha descrit com un esdeveniment crucial en la patogènesi i progressió del CaPr, però sense definir *per se* una via carcinogenètica en aquesta neoplàsia. La pèrdua de *PTEN* pot concórrer amb el reordenament d'*ERG* i ha estat definida com un esdeveniment subclonal posterior a la fusió genètica d'*ERG* [208]. Tanmateix, els nostres resultats recolzen que la pèrdua de PTEN no sembla estar relacionada amb les alteracions detectades a les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2.

En base a la literatura publicada fins a l'actualitat, el nostre seria el primer estudi en què s'ha analitzat l'expressió de les quatre proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2), i la seva relació amb l'estatus d'*ERG* i de PTEN. Els resultats del nostre estudi permeten suggerir que el gen de fusió *TMPRSS2-ERG* hauria de ser investigat a la pràctica clínica juntament amb l'expressió de les citades proteïnes reparadores per tal de caracteritzar a quina via carcinogenètica s'engloba el tumor prostàtic a analitzar.

5. 3. Expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 i anàlisi de supervivència (veure Annex 1)

Finalment, seguint amb un altre dels objectius de la present tesi doctoral, es va explorar l'existència d'una possible relació entre cadascuna de les alteracions immunohistoquímiques observades i la progressió de PSA, avaluant també la seva utilitat clínica en termes de diferències en la supervivència. Al nostre estudi, únicament la pèrdua

d'expressió de PMS2, malgrat tractar-se d'un esdeveniment molt infreqüent, va mostrar una associació estadísticament significativa amb una menor supervivència lliure de progressió de PSA. Tot i així, degut a l'escàs nombre de casos presents a la nostre cohort amb pèrdua d'expressió de PMS2 aquesta relació pot resultar imprecisa i es necessiten més estudis per confirmar aquesta associació.

En aquest sentit, alguns articles previs com el de Guedes *et al.* [169] i Langeberg *et al.* [177] també suggereixen que la deficiència d'alguns gens reparadors de l'ADN està relacionada amb trets adversos del CaPr. Concretament, Langeberg *et al.* [177] van reportar una possible relació entre una variant del gen *MLH1* i un major risc de desenvolupar CaPr, així com un major risc d'agressivitat i de recurrència de la malaltia. Guedes *et al.* [169] també van descriure que la pèrdua immunohistoquímica de MSH2 sembla ser més comuna en CaPr d'alt grau.

Al present estudi, la sobreexpressió de MSH6 va mostrar una associació estadísticament significativa amb els tumors prostàtics pertanyents al GG5, motiu pel qual es va decidir realitzar una anàlisi de supervivència (corba de Kaplan-Meier) comparant la sobreexpressió de MSH6 vs l'expressió *wt* (nivells basals) únicament en el subgrup de tumors GG5 (Log Rank test, $p = 0.1$), que finalment no va mostrar cap tendència estadísticament significativa.

Hi ha diversos articles que descriuen l'existència d'associacions entre expressions aberrants d'alguna de les proteïnes reparadores de l'ADN i un pitjor pronòstic [171, 172, 175]. Per exemple, Burger *et al.* [172] van reportar una associació estadísticament significativa entre la intensitat moderada/intensa de l'expressió de MSH2 en tumors prostàtics i una recurrència més primerenca de la malaltia, indicant un pronòstic clínic no favorable de la malaltia. Posteriorment, Norris *et al.* [171] també van publicar un treball en el qual els nivells d'expressió de PMS2 semblaven ser un predictor de temps de recurrència després de la cirurgia, documentant que l'elevació de PMS2 correlaciona també negativament amb el pronòstic. I seguint amb aquesta línia, recentment, Banks *et al.* [209] han reportat que al menys un 10% dels homes amb CaPr avançat són portadors de mutacions germinals als gens reparadors de l'ADN, incloent els gens del Sistema MMR, i que la presència de defectes en aquests gens en pacients amb malaltia metastàsica en comparació amb aquells que presenten malaltia localitzada, suggereix un rol d'aquests gens en la progressió tumoral i un fenotip potencialment més agressiu.

5. 4. Limitacions de l'estudi

Aquest estudi ha estat realitzat amb rigurositat plena per part de tots els professionals que han participat en ell però tot i així presenta limitacions, algunes de les quals ja han estat comentades al llarg del manuscrit. Una d'elles ha estat el nombre de casos amb pèrdua d'expressió immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN, que no permet assegurar la fortalesa de les relacions analitzades ni la falta de relacions que no hagin pogut ser detectades. En aquest sentit, l'estudi està limitat pels aspectes ètics i de conservació de les mostres després de la utilització del material. Un dels principals inconvenients és que en el CaPr és especialment difícil disposar d'abundant teixit tumoral en fresc viable, i pel que fa al material, un altre obstacle fa referència als tumors prostàtics més agressius, ja que les mostres dels tumors de major grau histològic són biòpsies d'agulla, que difícilment poden ser usades per a fer TMAs i que, per tant, permeten pocs estudis immunohistoquímics addicionals. A més, en aquells casos amb metàstasis òssies i, més rarament visceral, no acostuma a estar indicada la realització d'una biòpsia diagnòstica.

Una altra limitació inherent a qualsevol treball amb determinats tipus de tumors és l'heterogeneïtat tumoral intrínseca de moltes neoplàsies, com és el cas del CaPr. A més a més, un inconvenient important té a veure amb el curs relativament lent i indolent de la majoria de tumors prostàtics, que fa necessari seguiments molt llargs per tal de recollir casos amb evolució fatal o amb progressió a fases androgen-independents o metastàsiques. Per tal de minimitzar aquest problema, en el context del CaPr, s'acostuma a prendre com a referència el temps lliure de progressió bioquímica de PSA, que permet realitzar comparacions amb seguiments d'entre 2 i 5 anys.

Les troballes del present estudi han de ser corroborades mitjançant diverses estratègies de biologia molecular, aspecte que, tot i que s'esmenta en aquest apartat, constitueix en realitat el primer esglaió de la continuïtat d'aquesta línia de recerca específica.

5. 5. Futures línies de recerca i altres consideracions

En el context actual de la medicina personalitzada cada vegada són més els biomarcadors coneguts així com les dades moleculars inherents als diferents tipus tumorals, crucials per tal d'optimitzar i individualitzar les decisions medico-terapèutiques basades en un diagnòstic de qualitat.

Un coneixement millor i concret de la deficiència subjacent als gens reparadors de l'ADN que condueix a la inestabilitat de microsatèl·lits ha esdevingut de major importància en els darrers anys amb la recent aprovació per la FDA d'un tractament anticancerígen basat en la immunoteràpia (inhibidors anti-PD-1), que funciona bloquejant l'activitat de la molècula PD-1, una proteïna que pot estar present als tumors i que impedeix que les cèl·lules T reconeguin i combatin les cèl·lules tumorals. Al bloquejar farmacològicament PD-1, s'aconsegueix vulnerabilitzar el tumor permetent que el sistema immunitari tingui més habilitat en atacar-lo. Aquest tractament està actualment indicat en aquells pacients amb tumors sòlids metastàsics o irressecables que presentin deficiència dels gens del Sistema MMR o bé inestabilitat de microsatèl·lits, independentment de quina sigui la seva histologia, ja que poden beneficiar-se de forma potencial d'aquest tractament.

És per aquest motiu que pensem que una futura línia de recerca seria analitzar immunohistoquímicament el marcador PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) present a les cèl·lules tumorals, utilitzant la mateixa cohort de casos estudiada en el present estudi. Aquesta futura línia de recerca permetria analitzar l'expressió immunohistoquímica d'aquest biomarcador i contrastar-la amb les dades generades en aquest estudi per tal d'obtenir més informació d'utilitat alhora d'identificar els casos que potencialment es puguin beneficiar d'aquest tractament d'immunoteràpia.

Com s'ha assenyalat en l'apartat anterior, les troballes descriptives, de base morfològica i immunohistoquímica, donen peu inexorablement a investigar i correlacionar aquestes dades més a fons amb diferents estratègies científiques de biologia molecular i cel·lular.

6. CONCLUSIONS

1. En el càncer de pròstata, les alteracions de MSH2, MLH1 i PMS2 es manifesten com a pèrdua d'expressió mentre que, paradoxalment, l'alteració de MSH6 es manifesta amb un increment d'expressió.
2. D'acord amb els resultats del nostre estudi, la pèrdua d'expressió immunohistoquímica de MSH2, MLH1 i PMS2 sembla ser un esdeveniment relativament infreqüent al càncer de pròstata.
3. En canvi, l'increment de MSH6 s'observa en un percentatge molt notable de tumors prostàtics.
4. L'expressió immunohistoquímica de MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2 no mostra una relació estadísticament significativa amb la variable pronòstica "grup de grau" (OMS 2016).
5. Considerant l'agrupació de la variable pronòstica "grup de grau" en dues categories GG1-4 i GG5, la sobreexpressió immunohistoquímica de la proteïna MSH6 presenta una associació estadísticament significativa amb els tumors prostàtics més agressius (GG5).
6. No hi ha una relació estadísticament significativa entre la pèrdua d'expressió aïllada de MSH2 o MLH1, ni la pèrdua d'expressió combinada d'ambdues proteïnes i la variable pronòstica "grup de grau" (OMS 2016).
7. S'observa una associació estadísticament significativa entre la pèrdua d'expressió de MSH2 i l'absència del reordenament del gen *ERG* (tumors *ERG-wt*).
8. S'observa una relació estadísticament significativa entre la pèrdua d'expressió de MLH1, sola o combinada amb MSH2 i l'absència del reordenament del gen *ERG* (tumors *ERG-wt*).

9. Els tumors amb pèrdua d'expressió de MSH2 i MLH1 aïllades o combinades entre si podrien representar una de les vies alternatives de la carcinogènesi prostàtica, no associada a fusions genètiques.
10. La pèrdua d'expressió de PTEN no mostra una associació estadísticament significativa amb les alteracions en l'expressió de les proteïnes MSH2, MSH6 i MLH1.
11. El temps de supervivència lliure de progressió de PSA és significativament menor en aquells pacients amb pèrdua d'expressió de PMS2, tot i que caldria confirmar aquesta troballa en una cohort amb un nombre més gran de casos amb pèrdua de PMS2.
12. L'anàlisi immunohistoquímica de les proteïnes reparadores de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 i PMS2) conjuntament amb l'estudi de l'estatus d'ERG i PTEN podria ajudar a subclassificar millor el càncer de pròstata, fet que contribuiria a la més adequada estratificació i un més acurat maneig dels pacients.
13. L'estudi immunohistoquímic conjunt de les proteïnes MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, ERG i PTEN podria ser aplicable en l'àmbit assistencial, donat que constitueix una eina pràctica, reproducible i suficientment precisa.

7. BIBLIOGRAFIA

1. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256-69.
2. Epstein JI, Herawi M. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol.* 2006; 175 (3 Pt 1): 820-34.
3. Mosquera JM, Perner S, Genega EM, *et al.* Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3380–5.
4. Sakr WA, Billis A, Ekman P, *et al.* Epidemiology of high grade intraepithelial neoplàsia. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 200;(205):11-8.
5. Qian J, Wollan P, Bostwick DG. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 1997;28(2):143-8.
6. Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, *et al.* Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol.* 1993;24(3):298-310.
7. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, eds. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Fourth Edition. Lyon: IARC Press 8; 2016.
8. Coffey DS. Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology.* 2001;57(4 Suppl 1):31-8.
9. Nelson WG, Demarzo AM, Yegnasubramanian S. The diet as a cause of human prostate cancer. *Cancer Treat Res.* 2014;159:51-68.
10. Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. *Int J Urol.* 2013;20(2):150-60.
11. Elkahwaji JE, Hauke RJ, Brawner CM. Chronic bacterial inflammation induces prostatic intraepithelial neoplasia in mouse prostate. *Br J Cancer.* 2009;101(10):1740-8.

12. Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation and prostate cancer: a focus on infections. *Curr Urol Rep.* 2008;9(3):243-9.
13. Andreoiu M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol.* 2010;41(6):781-93.
14. Al-Ahmadie HA, Tickoo SK, Olgac S, *et al.* Anterior-predominant prostatic tumors: zone of origin and pathologic outcomes at radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(2):229-35.
15. Van der Kwast TH, Amin MB, Billis A, *et al.* International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference of handling and staging of radical prostatectomy specimens. Working Group 2: T2 Substaging and Prostate Cancer Volume. *Mod Pathol.* 2011;24(1):16-25.
16. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology.* 2012; 60:59-74.
17. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-9.
18. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 2010;183(2):433-40.
19. Cai T, Nesi G, Tinaci G, *et al.* Clinical importance of lymph node density in predicting outcome of prostate cancer patients. *J Surg Res.* 2011;167(2):267-72.
20. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, *et al.* International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 2012;61(6):1079-92.
21. Sakr WA, Hass GP, Cassin BF, *et al.* The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol.* 1993;150(2 Pt 1):379-85.
22. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, *et al.* The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol.* 2008;15(1):3866-71.
23. Scardino PT, Weaver T, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol.* 1992;23(3):211-22.

24. Andrews GS. Latent carcinoma of the prostate. *J Clin Pathol.* 1949; 2(3): 197–208.
25. Van der Kwast TH, Roobol MJ. Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2013;10(8):473-82.
26. Bjartell A. PSA and prostate cancer screening: the challenge of the new millennium. *Eur Urol.* 2007;52(5):1284–6.
27. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008;8(4):268–78.
28. Chen ME, Johnston DA, Tang K, *et al.* Detailed mapping of prostate carcinoma foci: Biopsy strategy implications. *Cancer.* 2000; 89(8): 1800-9.
29. Ochiai A, Troncoso P, Chen ME, *et al.* The relationship between tumor volume and the number of positive cores in men undergoing multisite extended biopsy: implication for expectant management. *J Urol.* 2005; 174(6): 2164-8.
30. Bostwick DG. The pathology of incidental carcinoma. *Cancer Surv.* 1995; 23:7-18.
31. Lopez-Beltran A, Cheng L, Montorsi F, *et al.* Concomitant bladder cancer and prostate cancer: challenges and controversies. *Nat Rev Urol.* 2017 Aug 16. doi: 10.1038/nrurol.2017.124
32. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, *et al.* Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer.* 2015; 137(7):1749-57.
33. Wetterauer C, Weibel M, Gsponer JR, *et al.* Incidental prostate cancer prevalence at radical cystoprostatectomy—importance of the histopathological work-up. *Virchows Arch.* 2014; 465(6):629-36.
34. Winkler MH, Livni N, Mannion EM, *et al.* Characteristics of incidental prostatic adenocarcinoma in contemporary radical cystoprostatectomy specimens. *BJU Int.* 2007;99(3):554-8.
35. Kurahashi T, Miyake H, Furukawa J, *et al.* Characterization of prostate cancer incidentally detected in radical cystoprostatectomy specimens from Japanese men with bladder cancer. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(1):73-9.

36. Pan J, Xue W, Sha J, *et al.* Incidental prostate cancer at the time of cystectomy: the incidence and clinicopathological features in Chinese patients. *PLoS One.* 2014;9(4):e94490.
37. Fourcade RO, Benedict A, Black LK, *et al.* Treatment costs of prostate cancer in the first year after diagnosis: a short-term cost of illness study for France, Germany, Italy, Spain and the UK. *BJU Int.* 2010;105(1):49-56.
38. Roehrborn CG, Black LK. The economic burden of prostate cancer. *BJU Int.* 2011;108(6):806-13.
39. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 1974; 111:58-64.
40. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(9):1228-42.
41. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, *et al.* A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-35.
42. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, *et al.* Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013;111(5):753-60.
43. Buyyounouski MK, *et al.* Prostate. En: Amin MB, *et al.* (eds.). *AJCC Cancer Staging Manual.* Eighth Edition. New York: Springer; 2017.
44. Grubb RL 3rd, Pinsky PF, Greenlee RT, *et al.* Prostate cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial: update on findings from the initial four rounds of screening in a randomized trial. *BJU Int.* 2008;102(11):1524-30.
45. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, *et al.* Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA.* 1994;271(5):368-74.

46. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, *et al.* Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*. 1998;279(19):1542-7.
47. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, *et al.* Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004;350(22):2239-46.
48. Kim EH, Andriole GL. Prostate-specific antigen-based screening: controversy and guidelines. *BMC Med*. 2015;13:61.
49. Duffy MJ. PSA in screening for prostate cancer: more good than harm or more harm than good? *Adv Clin Chem*. 2014;66:1-23.
50. Dell'atti L. Role of transrectal ultrasound in the diagnosis of extracapsular prostate cancer. *J Ultrasound*. 2014;17(1):47-51.
51. Shukla-Dave A, Hricak H. Role of MRI in prostate cancer detection. *NMR Biomed*. 2014;27(1):16-24.
52. Durmuş T, Reichelt U, Huppertz A, *et al.* MRI-guided biopsy of the prostate: correlation between the cancer detection rate and the number of previous negative TRUS biopsies. *Diagn Interv Radiol*. 2013;19(5):411-7.
53. Lecouvet FE, Lhommel R, Pasoglou V, *et al.* Novel imaging techniques reshape the landscape in high-risk prostate cancers. *Curr Opin Urol*. 2013;23(4):323-30.
54. Van Der Kwast T, Bubendorf L, Mazerolles C, *et al.* Guidelines on processing and reporting of prostate biopsies: The 2013 update of the pathology committee of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). *Virchows Arch*. 2013;463(3):367-77.
55. Srigley JR, Humphrey PA, Amin MB, *et al.* Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1568-76.
56. Rohr LR. Incidental adenocarcinoma in transurethral resections of the prostate. Partial versus complete microscopic examination. *Am J Surg Pathol*. 1987;11(1):53-8.

57. Samaratunga H, Montironi R, True L, *et al.* International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 1: specimen handling. *Mod Pathol.* 2011;24(1):6-15.
58. Noguchi M, Stamey TA, McNeal JE, *et al.* Relationship between systematic biopsies and histological features of 222 radical prostatectomy specimens: lack of prediction of tumor significance for men with nonpalpable prostate cancer. *J Urol.* 2001; 166(1): 104-9.
59. Epstein JI, Egevad L, Humphrey PA, *et al.* Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the prostate: report from the International Society of Urologic Pathology Consensus Conference. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):e6-e19.
60. Brimo F, Epstein JI. Immunohistochemical pitfalls in prostate pathology. *Hum Pathol.* 2012;43(3):313-24.
61. Suh JH, Park JH, Lee C, *et al.* Intrafocal heterogeneity of ERG protein expression and gene fusion pattern in prostate cancer. *Prostate.* 2017;77(14):1438-1445.
62. Chuang AY, DeMarzo AM, Veltri RW, *et al.* Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(8):1246–55.
63. SEOM: Información sobre el cáncer de próstata [Web de la Sociedad Española de Oncología Médica] 15 Mar, 2013. Disponible a: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/prostata>. Consultat 21 Set 2018.
64. Buyyounouski MK, Hanlon AL, Eisenberg DF, *et al.* Defining biochemical failure after radiotherapy with and without androgen deprivation for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(5):1455-62.
65. Amin MB, Lin DW, Gore JL, *et al.* The critical role of the pathologist in determining eligibility for active surveillance as a management option in patients with prostate cancer: consensus statement with recommendations supported by the College of American Pathologists, International Society of Urological Pathology, Association of

- Directors of Anatomic and Surgical Pathology, the New Zealand Society of Pathologists, and the Prostate Cancer Foundation. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(10):1387-405.
66. Montironi R, Hammond EH, Lin DW, *et al*; College of American Pathologists; International Society of Urological Pathology; Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Consensus statement with recommendations on active surveillance inclusion criteria and definition of progression in men with localized prostate cancer: the critical role of the pathologist. *Virchows Arch.* 2014;465(6):623-8.
 67. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Garmo H *et al*. Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Prostate Cancer - 29-Year Follow-up. *N Engl J Med.* 2018;379(24):2319-2329.
 68. Mohler JL, Armstrong AJ, Bahnson RR, *et al*. Prostate Cancer, Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14(1):19-30.
 69. Danneman D, Wiklund F, Wiklund NP, *et al*. Prognostic significance of histopathological features of extraprostatic extension of prostate cancer. *Histopathology.* 2013;63(4):580-9.
 70. Kapoor J, Namdarian B, Pedersen J, *et al*. Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. *J Urol.* 2013;190(6):2061-6.
 71. Jeong BC, Chalfin HJ, Lee SB, *et al*. The relationship between the extent of extraprostatic extension and survival following radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2015;67(2):342-6.
 72. Cao D, Humphrey PA, Gao F, *et al*. Ability of linear length of positive margin in radical prostatectomy specimens to predict biochemical recurrence. *Urology.* 2011;77(6):1409-14.
 73. Merrilees AD, Bethwaite PB, Russell GL, *et al*. Parameters of perineural invasion in radical prostatectomy specimens lack prognostic significance. *Mod Pathol.* 2008;21(9):1095-100.

74. Cooper CS, Eeles R, Wedge DC, *et al.* Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue. *Nat Genet.* 2015;47(4):367–72.
75. Lindberg J, Klevebring D, Liu W, *et al.* Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins. *Eur Urol.* 2013;63(2):347–53.
76. Baca SC, Garraway LA. The genomic landscape of prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:69.
77. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, *et al.* The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature.* 2011;470(7333):214–20.
78. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell.* 2013;153(3):666–77.
79. Gundem, G, Van Loo, P, Kremeyer, B, *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* 2015;520(7547):353–7.
80. Hong MK, Macintyre G, Wedge DC, *et al.* Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun.* 2015;6:6605.
81. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, *et al.* The mutational landscape of lethal castrate resistant prostate cancer. *Nature.* 2012;487(7406):239–43.
82. Mitchell T, Neal DE. The genomic evolution of human prostate cancer. *Br J Cancer.* 2015;113(2):193–8.
83. Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell.* 2015;163(4):1011–25.
84. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010;18(1):11–22.
85. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012;44(6):685–9.
86. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):433–47.

87. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013; 500(7463):415-21.
88. Cheng HH, Klemfuss N, Montgomery B, *et al.* A pilot study of clinical targeted next generation sequencing for prostate cancer: consequences for treatment and genetic counseling. *Prostate*. 2016;76(14):1303-11.
89. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, *et al.* Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol*. 2013;63(5):920-6.
90. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8.
91. Demichelis F, Setlur SR, Beroukhi R, *et al.* Distinct genomic aberrations associated with ERG rearranged prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(4):366-80.
92. Teixeira MR. Chromosome mechanisms giving rise to the TMPRSS2- ERG fusion oncogene in prostate cancer and HGPIN lesions. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(4):642–4; author reply 644.
93. Mehra R, Tomlins SA, Shen R, *et al.* Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol*. 2007;20(5):538–44.
94. Wang J, Cai Y, Ren C, *et al.* Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(17):8347–51.
95. Meiers I, Waters DJ, Bostwick DG. Preoperative prediction of multi- focal prostate cancer and application of focal therapy: review 2007. *Urology*. 2007;70(6 Suppl):3–8.
96. Furusato B, Gao CL, Ravindranath L. Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer. *Mod Pathol*. 2008;21(2):67-75.

97. Barry M, Perner S, Demichelis F, *et al.* TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications. *Urology*. 2007;70(4):630–3.
98. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, *et al.* TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*. 2006;8(10):826–32.
99. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, *et al.* TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(6):882–8.
100. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, *et al.* Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*. 2007;39(1):41–51.
101. Saramäki OR, Harjula AE, Martikainen PM, *et al.* TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3395–400.
102. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, *et al.* Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(10):3584–90.
103. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, *et al.* Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(2):159–70.
104. Steurer S, Mayer PS, Adam M, *et al.* TMPRSS2-ERG fusions are strongly linked to young patient age in low-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;66(6):978–81.
105. Attard G, Clark J, Ambrosine L, *et al.* Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene*. 2008;27(3):253–63.
106. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, *et al.* TMPRSS2:ERG fusion- associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(17):8337–41.

107. Cheville JC, Karnes RJ, Therneau TM, *et al.* Gene panel model predictive of outcome in men at high-risk of systemic progression and death from prostate cancer after radical retropubic prostatectomy. *J Clin Oncol.* 2008;26(24):3930–6.
108. Font-Tello A, Juanpere N, De Muga S, *et al.* Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *Prostate.* 2015;75(11):1216–26.
109. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, *et al.* ETS gene fusions in prostate cancer: From discovery to daily clinical practice. *Eur Urol.* 2009;56(2):275–86.
110. Demichelis F, Fall K, Perner S, *et al.* TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene.* 2007;26(31):4596–9.
111. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, *et al.* TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res.* 2009;69(4):1400–6.
112. Attard G, Clark J, Ambrosine L, *et al.* Heterogeneity and clinical significance of ETV1 translocations in human prostate cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(2):314–20.
113. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, *et al.* TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(7):3396–400.
114. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, *et al.* Characterization of TMPRSS2 : ETV5 and SLC45A3 : ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(1):73-80.
115. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, *et al.* Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* 2008;10(2):177–188.
116. Adamo P, Ladomery MR. The oncogene ERG: A key factor in prostate cancer. *Oncogene.* 2016;35(4):403-14.
117. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, *et al.* Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature.* 2007;448(7153):595-9.
118. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2009;6(8):429–439.

119. Esgueva R, Perner S, LaFargue JC, *et al.* Prevalence of TMPRSS2-ERG SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol.* 2010;23(4):539–546.
120. Svensson MA, LaFargue CJ, MacDonald TY, *et al.* Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer. *Lab Invest.* 2011;91(3):404–412.
121. Perner S, Rupp NJ, Braun M, *et al.* Loss of SLC45A3 protein (prostein) expression in prostate cancer is associated with SLC45A3-ERG gene rearrangement and an unfavorable clinical course. *Int J Cancer.* 2013;132(4):807–812.
122. Clark J, Attard G, Jhavar S, *et al.* Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene.* 2008;27(14):1993–2003.
123. Hernández S, Font-Tello A, Juanpere N, *et al.* Concurrent TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG rearrangements plus PTEN loss are not found in low grade prostate cancer and define an aggressive tumor subset. *Prostate.* 2016;76(9):854-65.
124. Hernández-Llodrà S, Juanpere N, Muga S de, *et al.* ERG overexpression plus SLC45A3 (prostein) and PTEN expression loss: Strong association of the triple hit phenotype with an aggressive pathway of prostate cancer progression. *Oncotarget.* 2017;8(43):74106-74118.
125. Theurillat JP, Udeshi ND, Errington WJ, *et al.* Prostate cancer. Ubiquitylome analysis identifies dysregulation of effector substrates in SPOP-mutant prostate cancer. *Science.* 2014;346(6205):85-89.
126. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, *et al.* The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell.* 2008;13(6):519-28.
127. Sherwood ER, Lee C. Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol.* 1995;13(5):290-6.

128. Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(11):3438–44.
129. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene.* 2000;19(56):6550–65.
130. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget.* 2017;8(21):35376-35389.
131. Lee MY, Chou CY, Tang M, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: Correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and Snail up-regulation. *Clin Cancer Res.* 2008;14(15):4743-50.
132. Liu ZC, Chen XH, Song HX, *et al.* Snail regulated by PKC/GSK-3 β pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. *Cell Tissue Res.* 2014;358(2):491-502.
133. de Muga S, Hernández S, Agell L, *et al.* Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol.* 2010;23(5):703-12.
134. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, *et al.* FGFR3 and Tp53 Mutations in T1G3 Transitional Bladder Carcinomas : Independent Distribution and Lack of Association with Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5444–50.
135. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, *et al.* Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006; 24(22):3664–71.
136. Hernández S, de Muga S, Agell L, *et al.* FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol.* 2009; 22(6):848-56.
137. Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol Cell Biochem.* 2003; 253(1-2):319-27.
138. Jiang D, Shen Y, Dai D, *et al.* Meta-analyses of methylation markers for prostate cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(10):10449–55.

139. Martignano F, Gurioli G, Salvi S, *et al.* GSTP1 Methylation and protein expression in prostate cancer: Diagnostic implications. *Dis Markers*. 2016; 2016:4358292.
140. Williams JL, Greer PA, Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer : an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet*. 2014;207(10–12):474–88.
141. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501.
142. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, *et al.* In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995;9(4):401-6.
143. Agell L, Hernández S, Salido M, *et al.* PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are infrequent events. *Mod Pathol*. 2011;24(3):443–52.
144. Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, *et al.* PTEN protein loss by immunostaining: Analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2011;17(20):6563–6573.
145. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, *et al.* Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012; 181(2):401–412.
146. Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, *et al.* PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade. *Mod Pathol*. 2013;26(3):435–447.
147. Lotan TL, Carvalho FL, Peskoe SB, *et al.* PTEN loss is associated with upgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy. *Mod Pathol*. 2015;28(1):128–137.
148. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, *et al.* Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2009;22(8):1083–1093.

149. King JC, Xu J, Wongvipat J, *et al.* Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet.* 2009;41(5):524–526.
150. Carver BS, Tran J, Gopalan A, *et al.* Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet.* 2009;41(5):619–624.
151. Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1474-9.
152. Ronen S, Abbott DW, Kravtsov O, *et al.* PTEN loss and p27 loss differ among morphologic patterns of prostate cancer, including cribriform. *Hum Pathol.* 2017;65:85-91.
153. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436(7051):725-30.
154. Narla G, Heath KE, Reeves HL, *et al.* KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science.* 2001; 294(5551):2563-6.
155. Chen C, Hyytinen ER, Sun X, *et al.* Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol.* 2003;162(4):1349-54.
156. Agell L, Hernández S, de Muga S, *et al.* KLF6 and TP53 mutations are a rare event in prostate cancer: distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations. *Mod Pathol.* 2008; 21(12):1470–8.
157. Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):605-14.
158. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-99.
159. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008; 18(1):85-98.
160. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9(1):89-96.

161. Liu J, Hanne J, Britton BM, *et al.* Cascading MutS and MutL sliding clamps control DNA diffusion to activate mismatch repair. *Nature*. 2016;539(7630):583-587.
162. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, *et al.* Human DNA repair genes. *Science*. 2001;291(5507):1284-9.
163. Jenkins MA. Role of MSH6 and PMS2 in the dna mismatch repair process and carcinogenesis. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009;18(4):625-36.
164. Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, *et al.* Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nat Commun*. 2014;5:4988.
165. Basu S, Majumder S, Bhowal A, *et al.* A study of molecular signals deregulating mismatch repair genes in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125560. doi: 10.1371/journal.pone.0125560. eCollection 2015.
166. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
167. Cancer Genome Atlas Network, Kandoth C, Schultz N, *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
168. Beltran H. DNA mismatch repair in prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(14):1782-4.
169. Guedes LB, Antonarakis ES, Schweizer MT, *et al.* MSH2 loss in primary prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(22):6863-6874.
170. Chen Y, Wang J, Fraig MM, *et al.* Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(10):4112-21.
171. Norris AM, Woodruff RD, D'Agostino RB Jr, *et al.* Elevated levels of the mismatch repair protein PMS2 are associated with prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(2):214-25.
172. Burger M, Denzinger S, Hammerschmied CG, *et al.* Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMAST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer. *J Mol Med*. 2006;84(10):833-41.

173. Velasco A, Albert PS, Rosenberg H, *et al.* Clinicopathologic implications of hMSH2 gene expression and microsatellite instability in prostate cancer. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(4):362-7.
174. Norris AM, Gentry M, Peehl DM, *et al.* The elevated expression of a mismatch repair protein is a predictor for biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(1):57-64.
175. Wilczak W, Rashed S, Hube-Magg C, *et al.* Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2017;38(1):19-27.
176. Schweizer MT, Cheng HH, Tretiakova MS, *et al.* Mismatch repair deficiency may be common in ductal adenocarcinoma of the prostate. *Oncotarget.* 2016;7(50):82504-82510. doi: 10.18632/oncotarget.12697.
177. Langeberg WJ, Kwon EM, Koopmeiners JS, *et al.* Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):258-64.
178. Li M, Zhang Q, Liu L *et al.* Expression of the mismatch repair gene hMLH1 is enhanced in non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *PLoS One.* 2013;8(10):e78500. doi: 10.1371/journal.pone.0078500. eCollection 2013.
179. Li M, Liu L, Wang Z, *et al.* Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep.* 2008;19(2):401-6.
180. Srivastava T, Chattopadhyay P, Mahapatra AK, *et al.* Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2004;66(1-2):51-7.
181. Velasco A, Hewitt SM, Albert PS, *et al.* Differential expression of the mismatch repair gene hMSH2 in malignant prostate tissue is associated with cancer recurrence. *Cancer.* 2002;94(3):690-9. Erratum in: *Cancer* 2002 May 15;94(10):2800
182. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication [U.S. Food and Drug Administration Web Site]. May 23, 2017. Available

at:

<https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm560040.htm>

Accessed Oct 7, 2018.

183. Le DT, Uram JN, Wang H, *et al.* PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-20.
184. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-94.
185. Maia S, Cardoso M, *et al.* The role of germline mutations in the BRCA1/2 and mismatch repair genes in men ascertained for early-onset and/or familial prostate cancer. *Fam Cancer.* 2016;15(1):111-21.
186. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohort of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78-85.
187. Hjelmberg JB, Scheike T, Holst K, *et al.* The Heritability of Prostate Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 ;23(11):2303-10.
188. Eeles R, Goh C, Castro E, *et al.* The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol.* 2014;11(1):18–31.
189. Spaepen M, Neven E, Sagaert X *et al.* EPCAM germline and somatic rearrangements in Lynch syndrome: identification of a novel 3'EPCAM deletion. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013; 52 (9):845-54.
190. Hampel H, Frankel WL, Martin E, *et al.* Screening for the Lynch Syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med.* 2005;352(18):1851-60.
191. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005;4(3):233-7.
192. Win AK, Young JP, Lindor NM, *et al.* Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):958-64.

193. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999;81(2):214-8.
194. Rouprêt M, Yates DR, Comperat E, *et al.* Upper urinary tract urothelial cell carcinomas and other urological malignancies involved in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) tumor spectrum. *Eur Urol*. 2008;54(6):1226-36.
195. Barrow PJ, Ingham S, O'Hara C, *et al.* The spectrum of urological malignancy in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2013;12(1):57-63.
196. Haraldsdottir S, Hampel H, Wei L, *et al.* Prostate cancer incidence in males with Lynch Syndrome. *Genet Med*. 2014;16(7):553-7.
197. Ryan S, Jenkins MA, Win AK. Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(3):437-49.
198. Dominguez-Valentin M, Joost P, Therkildsen C, *et al.* Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. *BMC Urol*. 2016;16:15.
199. Rosty C, Walsh MD, Lindor NM, *et al.* High prevalence of mismatch repair deficiency in prostate cancers diagnosed in mismatch repair gene mutation carriers from the colon cancer family registry. *Fam Cancer*. 2014;13(4):573-82.
200. Grindedal EM, Møller P, Eeles R, *et al.* Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(9):2460-7.
201. Engel C, Loeffler M, Steinke V, *et al.* Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4409-15.
202. Raymond VM, Mukherjee B, Wang F, *et al.* Elevated risk of prostate cancer among men with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2013;31(14):1713-8.
203. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, *et al.* Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):96-104.

204. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, *et al* (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer).
205. Wilt TJ, Jones KM, Barry MJ, *et al*. Follow-up of prostatectomy versus observation for early prostate cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(2):132-142.
206. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al*. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
207. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, *et al*. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(8):1246-51.
208. Gumuskaya B, Gurel B, Fedor H, *et al*. Assessing the order of critical alterations in prostate cancer development and progression by IHC: further evidence that PTEN loss occurs subsequent to ERG gene fusion. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013;16(2):209-15.
209. Banks P, Xu W, Murphy D, *et al*. Relevance of DNA damage repair in the management of prostate cancer. *Curr Probl Cancer*. 2017;41(4):287-301.

8. ANNEX

8. 1. Annex 1: Anàlisi de supervivència: Corbes de Kaplan – Meier

Es va realitzar una anàlisi de supervivència (corbes de Kaplan-Meier) per tal de valorar la supervivència lliure de progressió de PSA ajustada per edat segons la classificació pronòstica dels GG (OMS 2016) (Log Rank test, $p = 0.136$), així com segons la pèrdua o preservació de l'expressió de cadascuna de les proteïnes reparadores de l'ADN. Els resultats van ser els següents: pèrdua de MSH2 *vs* MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.564$), sobreexpressió de MSH6 *vs* MSH6 a nivells basals (*wt*) (Log Rank test, $p = 0.367$), pèrdua de MLH1 *vs* MLH1 *wt* (Log Rank test, $p = 0.548$), i pèrdua de PMS2 *vs* PMS2 *wt* (**Log Rank test, $p = 0.011$**). Malgrat que la pèrdua d'expressió de PMS2 va ser un event molt infreqüent, es va observar una associació estadísticament significativa amb un menor temps de supervivència lliure de progressió de PSA en aquells pacients amb pèrdua d'expressió de PMS2. (**Figures 16a-e**).

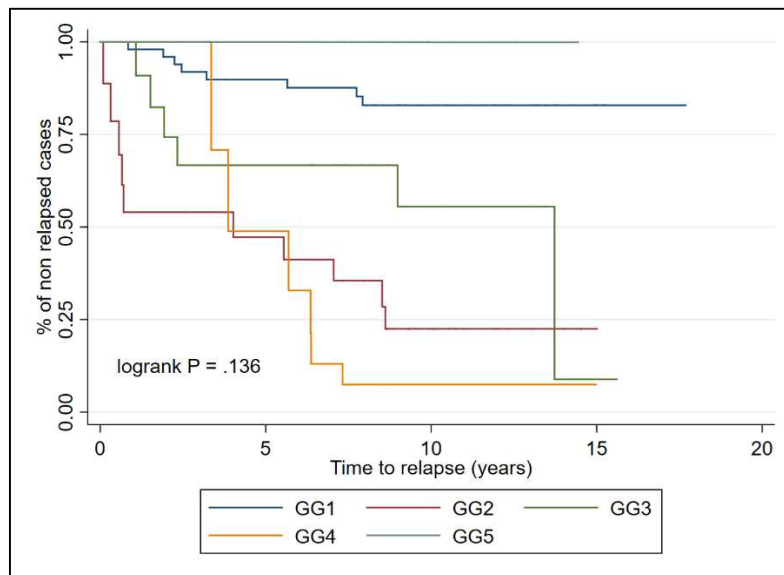


Figura 16a. Corba de supervivència de Kaplan-Meier segons la classificació GG (Log Rank test, $p = 0.136$).

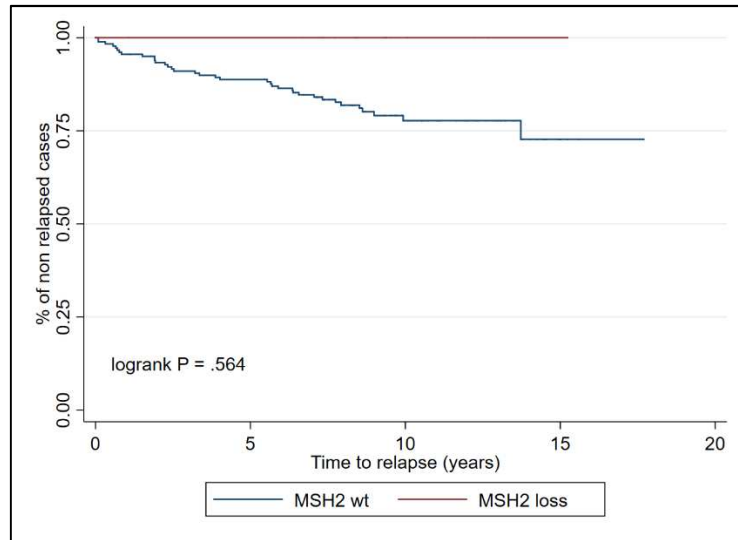


Figura 16b. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb pèrdua de MSH2 vs pacients MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.564$).

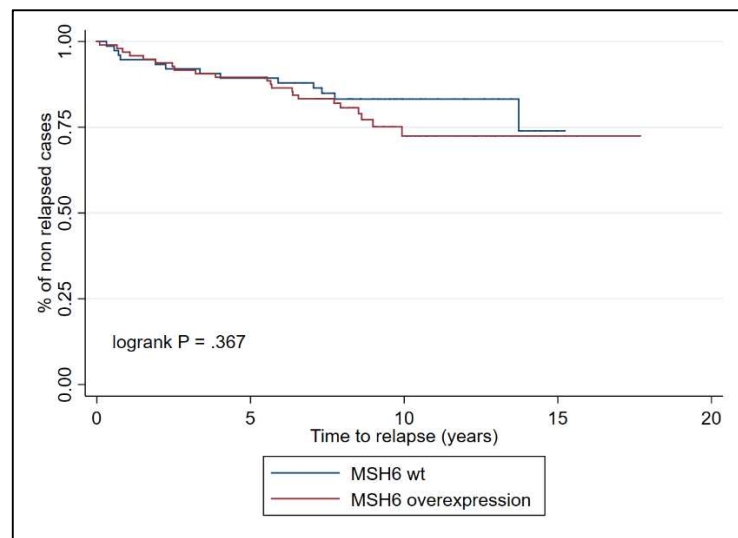


Figura 16c. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb sobreexpressió de MSH6 vs pacients amb MSH6 a nivells basals (*wt*) (Log Rank test, $p = 0.367$).

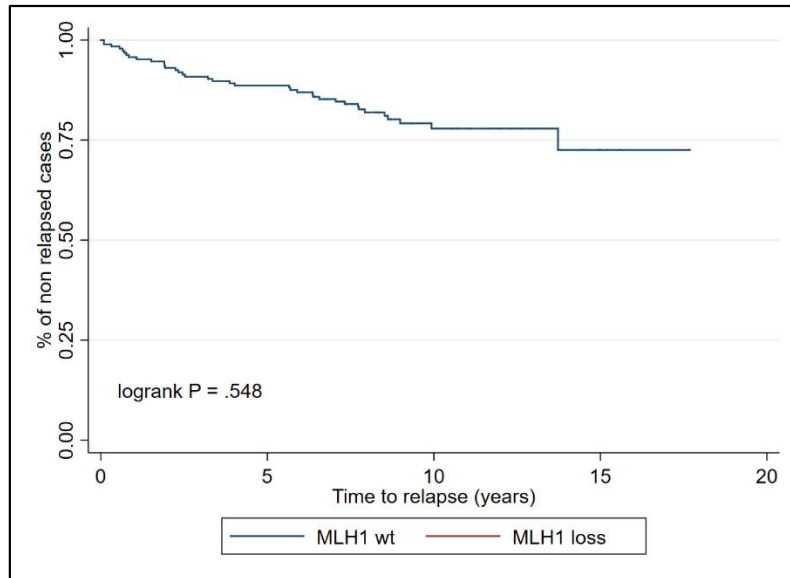


Figura 16d. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb pèrdua de MLH1 vs pacients MLH1 *wt* (Log Rank test, $p = 0.548$).

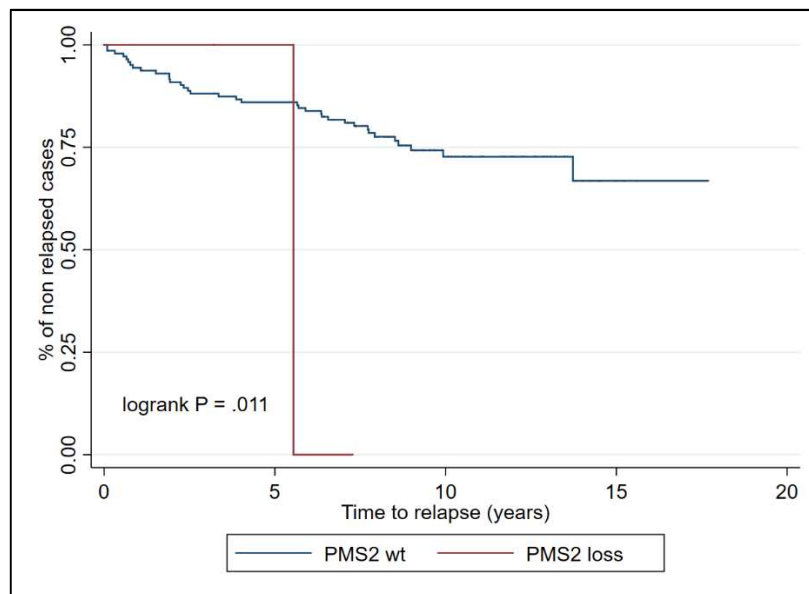


Figura 16e. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb pèrdua de PMS2 vs pacients PMS2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.011$).

Com la sobreexpressió de MSH6 va mostrar una tendència estadísticament significativa amb els tumors pertanyents al GG5, es va realitzar també una anàlisi de supervivència comparant la sobreexpressió de MSH6 vs l'expressió *wt* en aquest grup concret de tumors (Log Rank test, $p = 0.1$), sense observar-se una associació estadísticament significativa (**Figura 16f**).

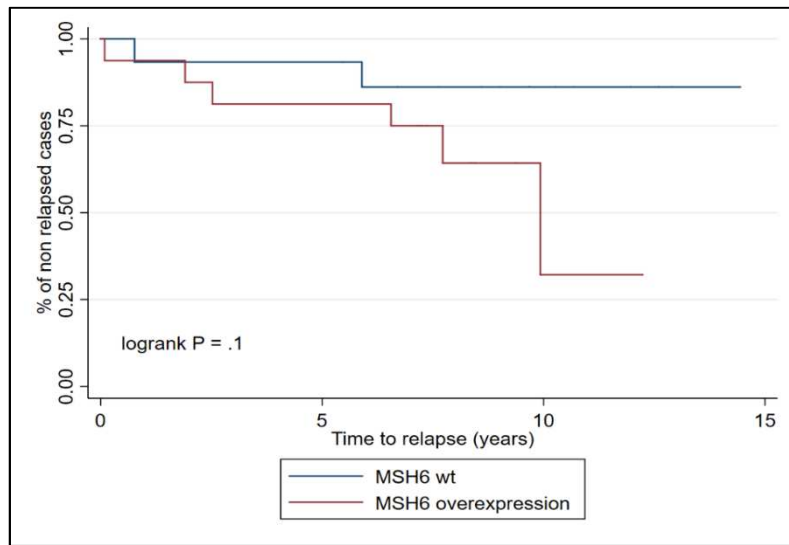


Figura 16f. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb sobreexpressió de MSH6 vs pacients amb MSH6 a nivells basals (*wt*) en categoria GG5 (Log Rank test, $p = 0.1$).

Igualment, es va analitzar la supervivència lliure de progressió de PSA ajustada per edat segons la pèrdua d'una de les proteïnes MLH1 i/o MSH2 vs MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.656$) i la doble pèrdua d'expressió de MLH1 i MSH2 vs MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.335$) (Figures 17a-b).

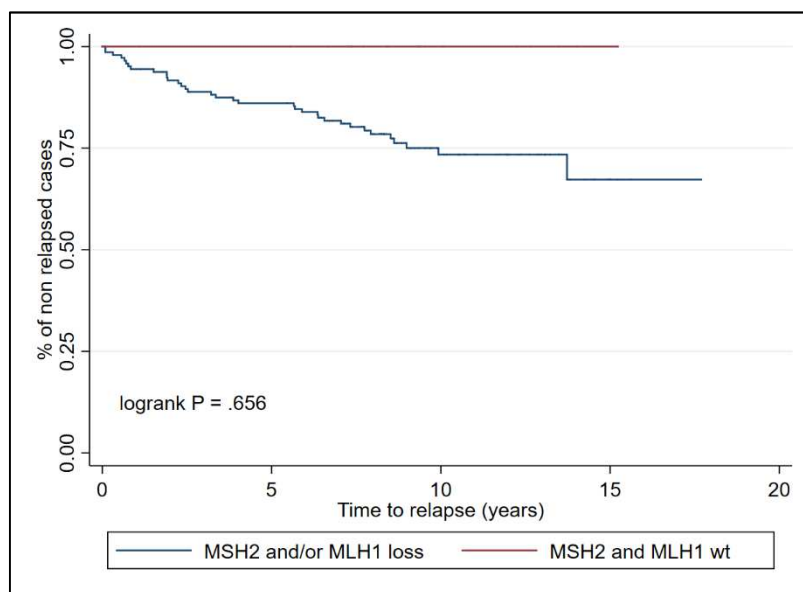


Figura 17a. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb pèrdua de MLH1 i/o MSH2 vs pacients MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.656$).

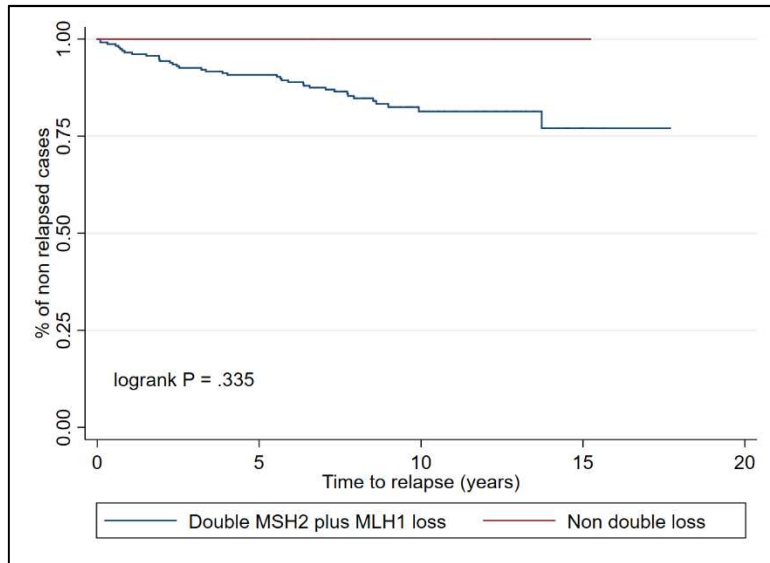


Figura 17b. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els pacients amb doble pèrdua d'expressió de MLH1 i MSH2 vs pacients MLH1 i MSH2 *wt* (Log Rank test, $p = 0.335$).

Com la pèrdua de MSH2 i la doble pèrdua de MSH2 i/o MLH1 van mostrar relacions estadísticament significatives amb l'expressió *wt* de la proteïna ERG, es van analitzar les següents combinacions: MSH2 perdut/ERG *wt* vs ERG+ (MSH2 perdut o *wt*) vs MSH2/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.679$), i MSH2 i/o MLH1 perduts/ERG *wt* vs ERG+ (MSH2 i/o MLH1 perduts o *wt*) vs MSH2/MLH1/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.797$). Les corbes de supervivència de Kaplan-Meier no van mostrar nivells de significació estadística (**Figures 18a-b**).

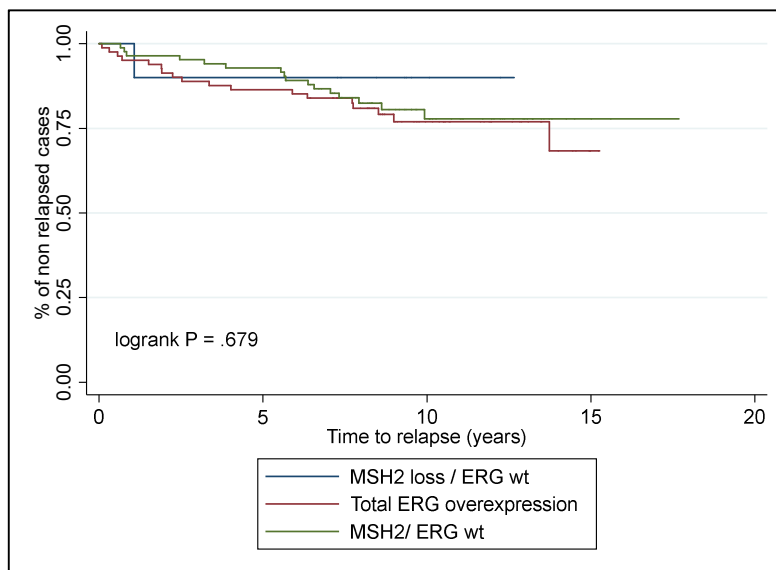


Figura 18a. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els tumors ERG+ (MSH2 perdut o *wt*) vs MSH2 perdut/ERG *wt* vs MSH2/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.679$).

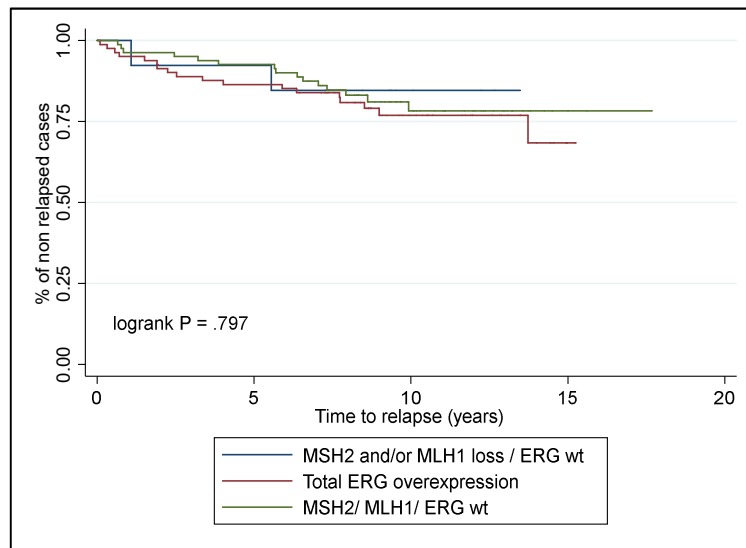


Figura 18b. Corba de supervivència de Kaplan-Meier comparant els tumors ERG+ (MSH2 i/o MLH1 perduts o *wt*) vs MSH2 i/o MLH1 perduts/ERG *wt* vs MSH2/MLH1/ERG *wt* (Log Rank test, $p = 0.797$).

La resta de característiques histopatològiques analitzades (multifocalitat tumoral i estadiatge patològic) no es van relacionar amb la supervivència global d'una manera significativa (Log Rank test, $p = 0.353$, $p = 0.602$).

9. AGRAÏMENTS

Aquest és un dels apartats més especials del treball i no m'agradaria oblidar-me de cap persona que, d'alguna manera o d'una altra, hagi contribuït en la seva realització i finalització.

En primer lloc, dono les gràcies al meu mentor i director de tesi, **Josep Lloreta**. Gràcies Pep, per oferir-me la possibilitat d'integrar-me al grup de recerca i de realitzar aquest treball. Sense el teu recolzament no hagués estat possible acabar-lo. Gràcies també per la teva paciència, per facilitar la meva rotació externa als EUA en el marc d'aquest treball i per tot el que m'has ensenyat sobre la patologia en general!

A la **Silvia Hernández**, directora de tesi, per la teva paciència i sinceritat, la teva energia i estimulació, tan alliçonadores. Gràcies per compartir amb mi la teva visió i pràctica de la recerca. Ha estat una gran experiència!

Al **Sergi Serrano**, per fer-me veure la importància de realitzar un projecte de tesi doctoral i influir positivament en la seva realització.

Als meus tutors de tesi, **Josep Maria Corominas** (Corooo!) i **Inés de Torres**, gràcies pels vostres ànims i per tot el recolzament amb les qüestions més burocràtiques del doctorat!

A tots els meus companys del GRECU, el Grup de Recerca en Càncer Genito-Urinari de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), per la seva vocació en la recerca i la seva col·laboració. Especialment, a la **Núria Juanpere**, la **Marta Lorenzo** i la **Laura Segalés**, per la vostra capacitat de treball i tota l'ajuda prestada. Núria, mil gràcies per tot el que m'has ensenyat sobre la uropatologia, per totes les hores analitzant els TMA's i el teu suport durant aquests anys!

Al **Lluís Fumadó**, uròleg del Servei d'Urologia de l'Hospital del Mar, per la teva ajuda amb la base de dades clíniques del treball.

A l'**Alba Font** i aquells dos mesos meravellosos a Boston... Recordo amb molta nostàlgia les nostres converses a hores intempestives al Lab del Dana-Farber sobre PCR i mil dubtes que jo tenia al respecte... Gràcies pel teu recolzament durant la rotació externa i després des de la distància gràcies a WhatsApp i Skype! Ho hem aconseguit!!

Als meus companys del **Servei d'Anatomia Patològica de la Mútua de Terrassa**, moltes gràcies pel vostres ànims, sobretot durant aquests últims mesos de doctorat en què heu suportat els meus nervis. Especialment, al meu cap de servei **Xavier Tarroch**, t'agraeixo molt totes les facilitats proporcionades en la consecució d'aquest treball!

A la **Pilar de las Heras**, per totes les estones i converses compartides, la teva sinceritat i per reafirmar-me en la meva convicció de finalitzar el doctorat. Gràcies per tot el que m'has ensenyat sobre la patologia i la vida en general!

Als meus companys del **Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital del Mar**, especialment els que van integrar l'equip durant els meus anys de residència i beca de recerca per totes les vivències i coneixements compartits durant aquests anys. Molt especialment, els hi vull agrair a la Ivonne, el Javi, la Laura, la Jèssica, els Jordis i el Chus el temps compartit i les grans experiències que m'han ajudat a ser la professional que sóc. Gràcies per la vostra amistat!

A **Cata** por tus ánimos, tus consejos y todo el apoyo prestado desde el otro lado del océano!

A **Carmen**, una peça fonamental a casa meva. Gràcies per proporcionar-me el temps per dedicar a la tesi, que hagués sigut més difícil de trobar sense la teva ajuda.

A la meva família, en especial als meus pares **José Luis** i **Nuria**, a la meva àvia **Maria**, i la meva sogra **Margarita**, pel vostre suport incondicional, gràcies al qual sé que em proposi el que em proposi i faci el que faci, sempre esteu allà. Sense vosaltres no ho hauria aconseguit!

Al meu marit **Oriol**, per la teva enorme paciència, per transmetre'm la teva tenacitat i serenitat en el que faig, i per la teva gran dedicació aquests últims mesos. M'ho has posat molt fàcil... I sobretot gràcies pel més gran que tenim: el nostre fill **Uriel**.

Els treballs presentats en aquesta tesi han estat finançats gràcies a les següents ajudes:

1. Beca Jordi Gras 2016-2017 de la Fundació IMIM
2. FIS/Instituto Carlos III/PI15/FEDER PI15/00452 del Ministeri Espanyol de Ciència, Innovació i Universitats

Aquesta tesi ha generat la següent publicació:

Albero-González R, Hernández-Llodrà S, Juanpere N, Lorenzo M, Lloret A, Segalés L, Duran X, Fumadó L, Cecchini L, Lloreta-Trull J. Immunohistochemical expression of mismatch repair proteins (MSH2, MSH6, MLH1 and PMS2) in prostate cancer: correlation with grade groups (WHO 2016), and ERG and PTEN status. *Virchows Arch.* 2019 (Article in press). **IF: 2.936**

