

Tesis doctoral

# Enzalutamida como radiopotenciador de líneas celulares de cáncer de próstata

Autora

Marta BARRADO LOS ARCOS

Directores

Dr. Fernando ARIAS DE LA VEGA & Dr. David ESCORS MURUGARREN

Departamento de Ciencias de la Salud

**upna**  
Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Es más fácil caminar colina abajo que hacia arriba,  
pero las mejores vistas se ven desde lo alto  
Arnold BENNETT



Me gustaría agradecer a todas las personas que de una u otra manera han hecho todo este trabajo posible.

A mis directores de tesis, Dr. Fernando Arias y Dr. David Escors. Gracias a Fernando por inculcarme el interés por la investigación; por proponerme y animarme a realizar el máster en Oncología Molecular, merced al cual dediqué parte de mi formación médica al campo más investigacional; por sus constantes ánimos y por su impulso para la realización de la presente tesis doctoral. Gracias a David, por las enseñanzas en un campo tan poco conocido para mí en aquel tiempo; por su paciencia y tiempo dedicado; por ser mi guía y mi maestro.

A mis tutores, Dra. Blanca Marín y Dr. Ignacio Encío. Su seguimiento, orientación y resolución de los problemas ha sido siempre rápida, eficaz, certera.

A todo el equipo de OncoInmunología de la Fundación Miguel Servet-Navarrabiomed por el buen trato recibido, la cálida acogida y la ayuda blindada en el tiempo que realicé con ellos la investigación. De forma especial a la Dra. Idoia Blanco-Luquin, sin ella y su inestimable ayuda, la realización de mi parte técnica no hubiese sido posible de esta manera; a la Dra. Grazyna Kochan, por su disponibilidad para resolver las dudas.

A mis compañeras de unidad, Dra. Elena Villafranca, Amaya Sola y Paola Navarrete. Ellas me han transmitido sus conocimientos y pasión por el cáncer de próstata y les debo mi formación en este campo. Es un honor haber trabajado, y trabajar, codo con codo con todas ellas. A mi compañero, Ignacio Visus, por su siempre desinteresada (y esencial) ayuda en cuestiones informáticas y en el diseño de las gráficas de esta tesis. Por servirme de apoyo en el día a día y formar un tándem laboral enriquecedor desde nuestro periodo formativo.

A todos los compañeros de Oncología Radioterápica y Radiofísica Hospitalaria del Complejo Hospitalario de Navarra por las enseñanzas recibidas en estos años, el compañerismo mostrado y los momentos compartidos. Mención especial a Enrique Martínez, jefe actual de nuestro servicio y durante mi periodo predoctoral, por animarme a desarrollar mis potenciales, plantearme retos y mostrarme su apoyo y confianza constantes. A Laura Bragado, por sus cálculos, planificación y ayuda en la irradiación de las líneas celulares. Y a Naira Fuentemilla, mi radiofísico de confianza.

A la beca de proyecto de investigación de la farmacéutica Astellas Oncology Inc y a las subvenciones recibidas como apoyo financiero para la realización de los experimentos investigacionales: subvención FIS (PI14/00579) del Instituto de Salud Carlos III, subvención del Gobierno de Navarra (BMED 033-2014, España), subvención de la Fundación Caixa (España), fundación SARAY (Navarra, España) y a la fundación de Sandra Ibarra.

A mis familiares y amigos por su comprensión, estima, apoyo y compañía. Muy especialmente a mi amigo Dr. Jorge Jiménez; por el diseño, las correcciones y los consejos recibidos; por hacerlo todo tan fácil y por el toque de humor en cada una de sus aportaciones.

A mis padres. Sus enseñanzas basadas en el respeto, la educación, la constancia, el esfuerzo y la superación han hecho de mí la persona en la que me he convertido.

A mi hermana Laura. Pilar fundamental en mi vida. Mi eterna compañera, desde antes de nacer.



## TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción .....	5
1.1  Cáncer de próstata. Epidemiología y cribado .....	5
1.2  Factores de riesgo .....	6
1.3  Estadificación y grupos de riesgo .....	15
1.4  Tratamiento según grupos de riesgo .....	19
1.5  Cáncer de próstata resistente a la castración.....	23
1.5.1  Terapia sistémica .....	27
1.6  Enzalutamida .....	33
1.6.1  Mecanismo de acción de enzalutamida .....	33
1.6.2  Farmacocinética.....	34
1.6.3  Ensayos clínicos con enzalutamida en CPRC metastáticos .....	35
1.6.4  Ensayos clínicos con Enzalutamida en CPRC no metastáticos.....	39
1.6.5  Ensayos clínicos con enzalutamida en cáncer de próstata hormono sensible (CPHS) .....	41
1.6.6  Combinación enzalutamida más radioterapia.....	43
2. Objetivos .....	47
3. Hipótesis.....	49
4. Materiales y métodos .....	51
4.1  Líneas celulares.....	51
4.2  Enzalutamida .....	53
4.3  Radioterapia .....	54
4.4  Citometría de Flujo .....	54
4.5  Monitorización celular en tiempo real (RTCA por sus siglas en inglés).....	55
4.6  Estadística .....	56
5. Resultados .....	57
5.1  Estimación de la IC50 de enzalutamida en dos líneas celulares de cáncer de próstata humano metastático mediante la monitorización celular en tiempo real .....	57
5.2  El pretratamiento con enzalutamida potencia la radioterapia. ....	60
6. Discusión.....	64
7. Conclusiones .....	72
8. Bibliografía.....	74



## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>68Ga-PSMA</b>	Galio68-Antígeno de membrana específico de la próstata
<b>ACTH</b>	Hormona Adrenocorticotrópica
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADT</b>	Terapia de Deprivación Androgénica
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AINES</b>	Antinflamatorios no esteroideos
<b>AJCC</b>	Comité Conjunto Americano del Cáncer
<b>APC</b>	Fluorocromo alloficocianina
<b>AR</b>	Receptor de Andrógeno
<b>ASCO</b>	Sociedad Americana de Oncología Clínica
<b>ASTRO</b>	Sociedad Americana de Oncología Radioterápica
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutado
<b>AUA</b>	Asociación Americana Urológica
<b>BRCA</b>	Gen de cáncer de mama
<b>CAPRA</b>	Grupo de evaluación de riesgo de próstata
<b>CDH13</b>	Cadherina T o Cadherina 13
<b>CHEK2</b>	Checkpoint Quinasa 2
<b>CHMP</b>	Comité de medicamentos de uso humano
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CPHS</b>	Cáncer de Próstata Hormono Sensible
<b>CPNE3</b>	Copine 3

<b>CPRC</b>	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
<b>CPRCM0</b>	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración No Metastático
<b>CYP</b>	Citocromo
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Agua destilada
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona
<b>DNAPKcs</b>	Subunidad catalítica de proteínas quinasas dependiente de ADN
<b>dMMR</b>	Deficiencia de Mismatch Repair
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EORTC</b>	Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer
<b>F-12</b>	Ham F-12
<b>FANCA</b>	Complementación Anemia Fanconi Grupo A
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bobino
<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>GGO</b>	Gammagrafía Ósea
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>GNRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>GUO</b>	Grupo de Urología Oncológica
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación de genoma completo
<b>Gy</b>	Gray
<b>HNF1B</b>	Hepatocito Nuclear 1 Homeobox B
<b>HOXB13</b>	Homeobox B13
<b>HR</b>	Hazard Ratio
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza
<b>IC50</b>	Concentraciones inhibitorias medias máximas
<b>ID</b>	Dosis inhibitorias
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulina-like
<b>IL17</b>	Interleuquina17
<b>KLK3</b>	Precursor antígeno prostático específico
<b>LBD</b>	Dominio de unión al ligando

<b>LH</b>	Hormona Leutenizante
<b>LMTK2</b>	Lemur Tirosin Quinasa 2
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimoles
<b>MLH1</b>	mutL Homologo 1
<b>MSH</b>	MutS Homologo
<b>MSMB</b>	Microseminoproteina Beta
<b>MSI-H</b>	Inestabilidad en microsatélites
<b>MTT</b>	3- [4,5-dimetiltiazolil-2] -2,5-difeniltetrazolio bromuro
<b>MV</b>	Megavoltios
<b>NCCN</b>	Red Nacional Integral del Cáncer
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PALB2</b>	Compañero y Localizador de BRCA2
<b>PAP</b>	Fosfatasa Ácida Prostática
<b>PARP</b>	Poliadenosina difosfato-ribosa polimerasa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PET/TAC</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>PMS2</b>	Post Meiotic Segregation Increased 2
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico
<b>ProtecT</b>	Pruebas prostáticas para cancer y tratamiento
<b>RAd51d</b>	Proteina de reparación del DNA RAD
<b>RMmp</b>	Resonancia Magnética Multiparamétrica
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>rpmi-1640</b>	Roswell Park Memorial Institute-1640
<b>RR</b>	Riesgo Relativo
<b>RT</b>	Radioterapia Externa
<b>RTCA</b>	Monitorización celular en tiempo real
<b>RTOG</b>	Grupo de Oncología de Radioterapia
<b>SBRT</b>	Radioterapia estereotáxica extracraneal
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido

<b>SOGUG</b>	Grupo Español de Oncología Genitourinaria
<b>SUO</b>	Sociedad de Oncología Urológica
<b>TC</b>	Tomografía Computarizada
<b>TNM</b>	Clasificación anatómica (extensión tumor, estado de los ganglios, presencia o ausencia de metástasis)
<b>URONCOR</b>	Grupo de Tumores Urológicos
<b>UM</b>	Unidades de Monitor
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>vs</b>	Versus
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Grados Centígrados

Se mantiene la nomenclatura en inglés para aquellas abreviaturas de uso normalizado en este idioma para la comunidad científica.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer de próstata. Epidemiología y cribado

Según los últimos datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de próstata es el segundo tumor más incidente en el mundo (29,3%) tras el cáncer de mama (46,3%) [figura 1]. También constituye el segundo tumor de mayor incidencia entre los varones en todo el mundo, después del cáncer de pulmón. Ocupa el sexto lugar en mortalidad por cáncer (7,6%) lo que le hace ser el tumor de mayor prevalencia entre los hombres de todo el mundo (1).

En España, según la misma fuente estadística consultada (1), el cáncer de próstata ocupa también el segundo puesto de incidencia en ambos sexos, siendo el tumor más incidente entre los varones españoles (73,1%) [figura 2]. Es el cuarto tumor en el ranking de mortalidad por cáncer entre la población española (7,4%) lo que le convierte en el tumor más prevalente también entre los varones españoles.

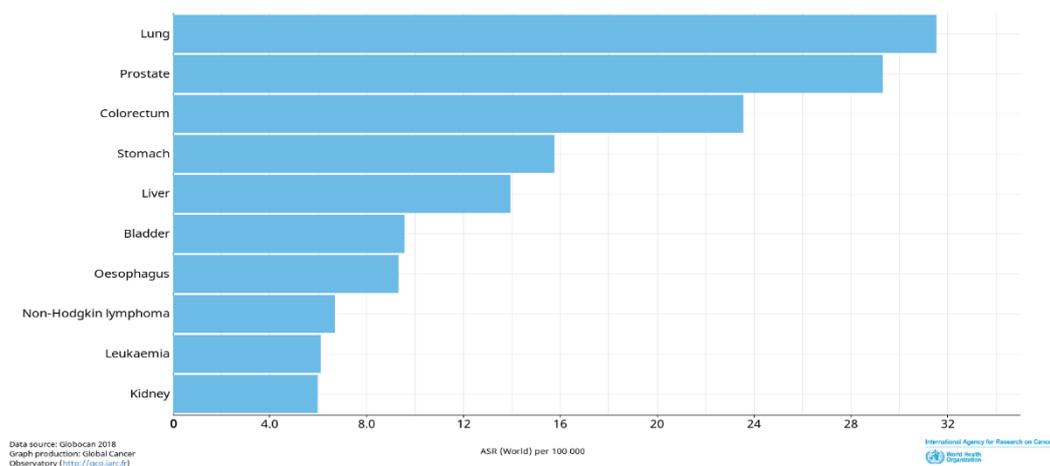


Figura 1. Incidencia mundial de tumores en ambos sexos, en 2018 (Fuente: OMS)

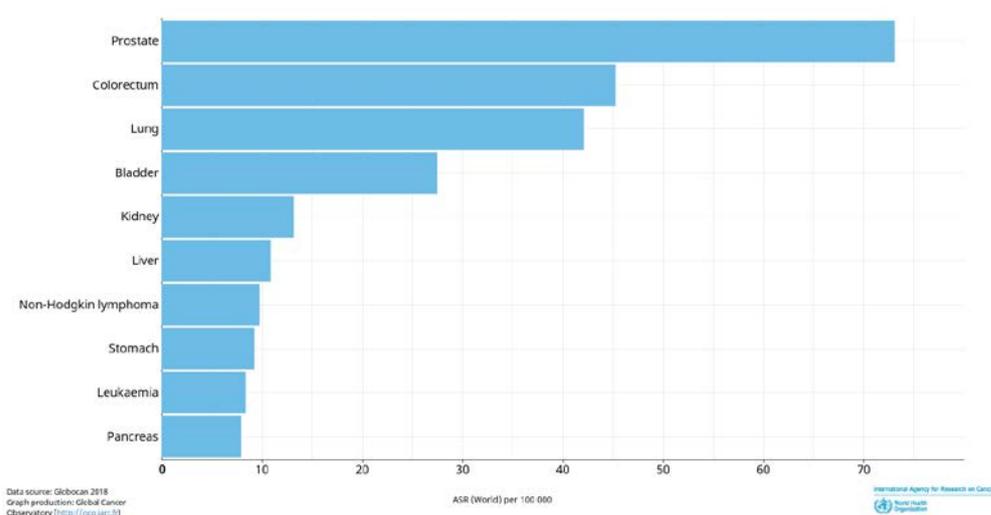


Figura 2. Incidencia de tumores en España en 2018 entre la población masculina (Fuente: OMS)

Las pruebas de cribado con medición de antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) en sangre tienen un gran efecto en las tasas de incidencia. Éstas pueden variar según los países dependiendo del nivel de implementación de los cribados con PSA. Por tanto, la incidencia será mayor en aquellos países desarrollados donde el número de pruebas de cribado y de realización de biopsias prostáticas sea más elevado.

Aunque los ensayos aleatorizados sobre el cribado con PSA tienen limitaciones metodológicas importantes, la mejor evidencia disponible (2) sugiere que el cribado confiere un pequeño beneficio absoluto para reducir la mortalidad por cáncer de próstata y el riesgo de desarrollar metástasis. Sin embargo, los posibles daños causados por las pruebas de detección falsas positivas (por ejemplo, biopsia de próstata, ansiedad, sobrediagnóstico y complicaciones del tratamiento) son comunes. Los médicos y pacientes deben sopesar estos beneficios frente a los posibles daños a corto y largo plazo del cribado, incluidas las complicaciones de las biopsias y el tratamiento posterior, así como el riesgo de sobrediagnóstico y sobretratamiento.

## 1.2 Factores de riesgo

De los varios factores de riesgo conocidos para desarrollar cáncer de próstata, los más importantes son la edad, la etnia, los factores genéticos y, posiblemente, los factores dietéticos

### 1.2.1 Edad

De entre todas las neoplasias malignas humanas, el cáncer de próstata tiene una de las asociaciones más fuertes con la edad como factor de riesgo para su desarrollo.

El diagnóstico de cáncer de próstata rara vez ocurre antes de los 40 años, pero la incidencia aumenta rápidamente a partir de entonces, alcanzando su pico de incidencia entre los 65 y los 74 años. Aunque las tasas de prevalencia notificadas para el cáncer de próstata oculto han variado sustancialmente en diferentes estudios, la prevalencia aumentó drásticamente con la edad en todos los estudios (3).

### 1.2.2 Etnia

El cáncer de próstata es más común en hombres negros que en blancos o hispanos, tal vez relacionados con una combinación de factores dietéticos y/o genéticos (4-6).

Además de las tasas de incidencia más altas, la edad de aparición en los hombres afroamericanos es inferior con respecto a la edad del resto de varones de distintas etnias. En una serie multiinstitucional de más de 12.000 casos, el 8,3 por ciento de los pacientes de raza negra y el 3,3 por ciento de los pacientes de etnia blanca tenían menos de 50 años de edad al diagnóstico de cáncer de próstata (7).

Muchos estudios han encontrado que los hombres afroamericanos también tienen niveles séricos más altos de PSA, tienen peores puntajes de Gleason, se diagnostican en una etapa más avanzada de la enfermedad (8-9) y reciben cuidados médicos infra óptimos (10). Además, otro estudio encontró que los hombres afroamericanos diagnosticados en una etapa temprana de la enfermedad tienen una tasa más alta de lo esperado de recurrencia bioquímica (11).

### 1.2.3 Factores genéticos

El cáncer de próstata tiene un fuerte componente genético y hereditario.

Los factores genéticos, especialmente mutaciones germinales en genes de reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico) como BRCA2, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de ciertos cánceres de próstata y se han asociado con

enfermedades más agresivas (12). BRCA1 (13), ATM (14) y CHEK2 (15) son otros de los genes implicados.

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) se han utilizado para identificar los factores genéticos más comunes que influyen en el riesgo de padecer cáncer de próstata en la población en general (12). Utilizando paneles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se han identificado más de 100 loci que se asocian con un diagnóstico de cáncer de próstata (16,17), incluyendo múltiples loci en la región 8q24 (18,19) y la región 17q (20,21). Se estima que estas variantes explican aproximadamente el 33 por ciento del riesgo familiar de cáncer de próstata. Algunos de los SNP asociados con mayor riesgo de cáncer de próstata son HOXB13, MSMB, LMTK2, KLK3, CPNE3, IL16, CDH13 y HNF1B (22-24).

Mutaciones en genes de predisposición de cáncer conocidos (como BRCA2, BRCA1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) indican la posibilidad de un cáncer hereditario independientemente de los antecedentes familiares de cáncer.

#### 1.2.4 Dieta

La asociación entre la ingesta de nutrientes y el riesgo de cáncer de próstata se ha revisado previamente en otros trabajos (25,26).

- Grasa animal: Una dieta rica en grasa animal puede ser un factor importante en el desarrollo de cáncer de próstata (27-29). En particular, la ingesta de grandes cantidades de ácido  $\alpha$ -linolénico y bajas cantidades de ácido linoleico parecen estar asociadas con un mayor riesgo; esta combinación es común en la carne roja y algunos productos lácteos (30,31).
- Vegetales: Una dieta baja en vegetales puede ser otro factor de riesgo para el cáncer de próstata (28,32). Por otro lado, no existe ninguna asociación entre el consumo de frutas y/o verduras y el riesgo de cáncer de próstata (33). La alta ingesta de vegetales crucíferos (particularmente brócoli y coliflor) se asocia con un riesgo significativamente menor de diagnosticarse tumores de próstata en estadios avanzados.
- Productos derivados del licopeno y tomate: Los productos derivados del tomate son ricos en licopeno, que tiene potentes propiedades antioxidantes. Los estudios

sobre el impacto de los alimentos que contienen licopeno en el riesgo de cáncer de próstata han arrojado en la literatura resultados contradictorios (34-36). Sin embargo, cabe destacar que un análisis reciente de una cohorte de 51.529 hombres ha sugerido que la ingesta dietética de licopeno se asocia con una menor incidencia de cáncer de próstata y un menor riesgo de cáncer de próstata letal (37) indicando, además, un posible papel de inhibición de la neoangiogénesis tumoral como mecanismo subyacente a estas observaciones.

- Soja: Los fitoestrógenos (flavones, isoflavonas, lignanos) son compuestos vegetales de origen natural que tienen actividad similar a la de los estrógenos. Se postula que los fitoestrógenos como los que se encuentran en los alimentos de soja pueden reducir el riesgo de cáncer de próstata ya sea a través de sus propiedades estrogénicas inherentes (que alteran favorablemente el ambiente hormonal), o por la inhibición de la enzima 5-alfa reductasa. La mayor ingesta de productos de soja entre los hombres asiáticos podría explicar la menor incidencia de cáncer de próstata entre estos hombres. Aunque se han realizado pocos estudios en humanos, estudios de cohortes han demostrado un modesto beneficio protector de la ingesta de soja en el riesgo de cáncer de próstata (38,39). Un metaanálisis de dos cohortes y seis estudios de caso-control que abordaron el beneficio protector de la ingesta de alimentos de soja en el riesgo de cáncer de próstata produjo una estimación global del riesgo de 0,70 (Intervalo de confianza [IC] del 95% 0,59-0,83) (40).
- Ácidos grasos Omega-3 y aceite de pescado: Estudios caso-control de muestras séricas de dos grandes ensayos encontraron que los altos niveles de ácidos grasos omega-3, como los que se encuentran en aceite de pescado, se asociaron con un mayor riesgo de cáncer de próstata de alto grado y clínicamente significativo (41,42).
- Alcohol: Los estudios que examinan la asociación entre la ingesta de alcohol y el riesgo de cáncer de próstata han publicado resultados mixtos. Un metaanálisis de 2001 basado en 235 estudios que incluyeron más de 117.000 casos no identificó una relación consistente entre el alcohol y el cáncer de próstata (43). Por otro lado, un estudio de cohortes prospectivo ha sugerido que el consumo de alcohol se asocia con un menor riesgo de cáncer de próstata letal (44).
- Café: El aumento del consumo de café parece estar asociado con una disminución del riesgo de cáncer de próstata letal (45). La relación inversa

parece estar relacionada con componentes de café distintos de la cafeína; se vio un nivel similar de protección para aquellos que bebieron café con o sin cafeína.

o Suplementos vitamínicos y minerales:

- Multivitamínicos: El uso regular de multivitamínicos no parece afectar el riesgo de cáncer de próstata temprano o localizado (46). Sin embargo, dos estudios han observado un mayor riesgo de cáncer de próstata avanzado o mortal en hombres que consumieron cantidades relativamente grandes de multivitamínicos (46,47).
- Ácido fólico y vitamina B12: Los niveles altos de ácido fólico sérico y vitamina B12 pueden estar asociados con un pequeño aumento en el riesgo de cáncer de próstata. Los datos que respaldan una posible relación causal provienen de estudios de cohortes y de un análisis secundario de un ensayo aleatorizado (48).
- Selenio y vitamina E: La relación entre el cáncer de próstata y la ingesta y nivel de selenio es compleja. Los datos más completos provienen de un metaanálisis (49). En los casos en los que se midieron los niveles de selenio en la sangre, el nivel de selenio no se asoció con una diferencia en el riesgo de padecer cáncer de próstata; sin embargo, los niveles altos en sangre se asociaron con un menor riesgo de enfermedad agresiva. En aquellos casos en los que el selenio se midió en las uñas en lugar de en la sangre, el nivel de selenio de las uñas se asoció con una disminución de la incidencia de cáncer de próstata.

Los resultados de ensayos aleatorizados a gran escala que evalúan específicamente estos compuestos como agentes quimiopreventivos no han proporcionado evidencia de disminución de riesgo de cáncer de próstata y, de hecho, puede haber un aumento del riesgo estadísticamente significativo con vitamina E, como se ha demostrado en grandes ensayos prospectivos (50).

- Zinc: Al menos dos estudios han sugerido una asociación entre el uso de suplemento de zinc y un mayor riesgo de cáncer de próstata (51,52). En comparación con los no consumidores, los hombres que consumieron más de 100 mg de zinc como suplemento diario tenían un riesgo de 2,29 veces

mayor de cáncer de próstata; el riesgo relativo (RR) fue de 2,37 en aquellos que tomaron zinc durante 10 o más años.

- Calcio y vitamina D: Se ha sugerido un vínculo entre la ingesta de productos lácteos y calcio y un mayor riesgo de cáncer de próstata en muchos (53-56), pero no en todos los estudios (57,58). En un metaanálisis que examina la asociación de productos lácteos y la ingesta de calcio y el riesgo de cáncer de próstata, los hombres con ingesta más alta de productos lácteos (RR 1.11, IC 95% 1.0 a 1.22) y calcio (RR 1.39, IC 95% 1.09 a 1.77) fueron más propensos a desarrollar cáncer de próstata que aquellos con ingesta más baja (55). Los estudios epidemiológicos sugieren que la relación entre los niveles de vitamina D y la incidencia de cáncer de próstata es compleja. La deficiencia de vitamina D se ha sugerido como una "vía común" subyacente a la asociación del riesgo de cáncer de próstata con otros factores de riesgo epidemiológicos (por ejemplo, edad, raza afroamericana y área geográfica de residencia) (59). Otros estudios han demostrado un vínculo entre ciertos haplotipos del receptor de vitamina D, los niveles de vitamina D y el riesgo de cáncer de próstata (5,54). Sin embargo, los estudios que analizan directamente los niveles de vitamina D y el riesgo de cáncer de próstata han sido contradictorios (60,61).

#### 1.2.5 Tabaco

La mayor revisión sistemática publicada y su metaanálisis incluyen datos de más de 50.000 hombres con cáncer de próstata y más de 11.000 muertes (62). Demuestra un riesgo significativamente mayor de muerte por cáncer de próstata en pacientes fumadores (RR 1.24, IC 95% 1.18-1.31). El mayor riesgo se correlacionó con el aumento del número de cigarrillos fumados.

En un segundo metaanálisis de 16 estudios observacionales incluyendo 22.549 hombres tratados con cáncer de próstata localizado, en comparación con los que nunca fumaban, los fumadores actuales y los exfumadores tenían un riesgo significativamente mayor de recurrencia bioquímica (63). Sin embargo, los fumadores actuales tenían un mayor riesgo de metástasis (Hazard Ratio) [HR] 2.51, IC 95% 1.80-3.51) y mortalidad específica por cáncer de próstata (HR 1.89, 95% IC 1.37-2.60), mientras que los

exfumadores este aumento de riesgo no lo tenían. Los resultados fueron similares en hombres tratados con prostatectomía radical o radioterapia.

#### 1.2.6 Niveles hormonales y obesidad

- Hormonas sexuales: Múltiples estudios han analizado la relación entre los niveles séricos de varias hormonas sexuales y el riesgo de desarrollar cáncer de próstata. Los datos más concluyentes provienen de un análisis de 18 ensayos prospectivos, que incluyó 3886 hombres con cáncer de próstata y 6438 controles (64). Las concentraciones séricas de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y otros derivados activos de andrógenos obtenidos antes del diagnóstico no se asociaron con un mayor riesgo de cáncer de próstata. Además, no se vio ninguna asociación con los niveles séricos de estrógenos (estradiol, estradiol libre).
- Insulina y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF): Un metaanálisis basado en datos individuales de pacientes de 3700 hombres con cáncer de próstata y 5200 controles encontró un modesto aumento de riesgo de cáncer de próstata en aquellos hombres con los niveles circulantes más altos de IGF-1 (65). Del mismo modo, la mayoría de las series (66-68), pero no todas (69,) apoyan una relación entre los niveles más altos de insulina sérica, el índice cintura-cadera (un marcador de distribución de grasa corporal) y el riesgo de cáncer de próstata.
- Obesidad: Múltiples estudios han analizado la relación entre la incidencia de cáncer de próstata y el peso. Aunque estos estudios han arrojado resultados variables, los metaanálisis realizados han demostrado una asociación pequeña, pero estadísticamente significativa, entre la obesidad y la incidencia de cáncer de próstata (70-72). Entre los pacientes con cáncer de próstata, existe una clara relación entre la obesidad y la agresividad de la enfermedad, con un aumento en la tasa de recurrencia bioquímica después del tratamiento y la mortalidad cáncer específica (73,74). Los aumentos en la tasa de recurrencia y la mortalidad son proporcionales al grado de obesidad.
- Actividad física: Aunque los datos que vinculan el índice de masa corporal y la agresividad del cáncer de próstata sugerirían que la actividad física regular puede ser beneficiosa, que el ejercicio proteja contra el desarrollo o la progresión del cáncer de próstata es incierto (75).

### 1.2.7 Otros factores

- Inhibidores de la enzima 5 alfa reductasa (Finasteride, Dutasteride): LA US Food and Drug Administration (FDA) ha concluido que, aunque los inhibidores de la 5-alfa reductasa reducen el PSA, potencialmente aumentan el riesgo de cáncer de próstata de alto grado (76).
- Infecciones e inflamaciones crónicas:
  - Prostatitis: Distintos estudios de caso-control y un metaanálisis sugieren un aumento de riesgo, modesto, de desarrollar cáncer de próstata entre pacientes afectados de prostatitis (77-79). Una de las causas que puede explicar esta relación directa es que los pacientes que sufren prostatitis aumentan los valores séricos de PSA, hecho que provoca la realización de más biopsias prostáticas y, por consiguiente, puede aumentar el número de nuevos casos diagnosticados.
  - Infección por *Trichomona vaginalis*: Estudios de caso-control han demostrado una relación directa entre la incidencia de seropositividad para anticuerpos contra *Trichomonas vaginalis* y cáncer de próstata (80,81).
- Carcinógenos ambientales:
  - Agente Naranja: La exposición a este herbicida defoliante parece estar asociado con una mayor incidencia de cáncer de próstata, siendo estos tumores más agresivos (82-84).
  - Cloredocona: Insecticida con propiedades estrogénicas que aumenta, de manera estadísticamente significativa, el riesgo de desarrollar cáncer de próstata (85).
  - Bisfenol A: Ampliamente usado para la fabricación de plásticos y resinas. La exposición a concentraciones anormales de estrógeno en las primeras etapas de la vida puede iniciar cambios en las células madre de la próstata. Estos cambios pueden perdurar en la vida adulta y potencialmente contribuir al desarrollo de cáncer de próstata, aunque esta asociación continúa siendo incierta (86).
- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y aspirina: La ingesta de estos fármacos se ha asociado con un menor riesgo de algunos tipos de cáncer, particularmente cáncer colorrectal. Sin embargo, la disminución de riesgo en cáncer de próstata es incierta (87-89). Un metaanálisis, donde se analizaron

datos de 24 estudios observacionales, examinó los posibles efectos de la aspirina demostrando un menor riesgo de incidencia de cáncer de próstata y de cáncer de próstata avanzado (90).

- Estatinas: La evidencia epidemiológica sugiere que el uso de estatinas puede tener un impacto beneficioso en la progresión y mortalidad del cáncer de próstata (91-94).
- Vasectomía: Que la vasectomía aumente el riesgo de desarrollar cáncer de próstata es controvertido, aunque la evidencia sugiere que, si hay un riesgo, es muy bajo (95,96).
- Frecuencia de eyaculación: Dos estudios de casos-controles han sugerido una asociación entre la frecuencia eyaculatoria y un menor riesgo de cáncer de próstata (97,98). Los hombres que tenían cinco o más eyaculaciones por semana a sus 20 años (pero no a sus 30 o 40 años) tenían un riesgo significativamente menor de cáncer de próstata (*odds ratio* 0,66) que aquellos que tenían menos eyaculaciones. Esta asociación no se ha encontrado en la frecuencia eyaculatoria en mayores franjas de edad (99).
- Exposición luz ultravioleta (UV): En un estudio de caso-control la exposición a la luz ultravioleta (UV) tuvo un efecto protector en el desarrollo de cáncer de próstata (100). No está claro que cualquier patrón de exposición pueda reducir con éxito el riesgo de cáncer de próstata sin aumentar el riesgo de cáncer de piel. Aunque el mecanismo subyacente a esta asociación es incierto, parece que pueda ser debido a la implicación de la vitamina D y/o su receptor (101).
- Procedimientos diagnósticos radiológicos: Parece haber un posible aumento en el riesgo de cáncer de próstata debido a procedimientos radiológicos de diagnóstico (102).
- Antecedente de radioterapia previa pélvica: Aunque la radioterapia externa (RT) para el cáncer de próstata se asocia con un mayor riesgo de cáncer rectal, la RT para el cáncer rectal no se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de próstata posterior (103). Se postulan dos mecanismos para explicar esta reducción de riesgo de cáncer de próstata tras la RT pélvica previa. La dosis de RT incidental en próstata puede tener un efecto biológico, reduciendo o esterilizando áreas subclínicas de la enfermedad. Además, esta irradiación dispersa de la próstata puede disminuir el PSA sérico, lo que conduciría a un menor número de biopsias prostáticas (104,105).

Existen calculadoras en la red (*online*), validadas de forma independiente, para estimar el riesgo individual de desarrollar cáncer de próstata. Su uso es limitado y su empleo debe entenderse como una herramienta más para ayudar al paciente y/o clínico a tomar la decisión de realizar o no biopsias prostáticas para estudio diagnóstico de cáncer de próstata.

### 1.3 Estadificación y grupos de riesgo

En países desarrollados, el cáncer de próstata se diagnostica sobre todo en estadios iniciales, órgano confinado, debido en parte a la detección con cribado de PSA (106). En estos casos suele ser multifocal, originándose en el 80-85% en la zona periférica (accesible al tacto rectal), en el 10-15% en la zona transicional y en el 5-10% en la próstata central (107).

Para los hombres con cáncer de próstata recién diagnosticado, los factores más importantes en la selección del tratamiento inicial incluyen los siguientes:

- Extensión anatómica de la enfermedad [extensión tumor, estado de los ganglios, presencia o ausencia de metástasis (TNM)].
- Grado histológico (grupo de puntuación/grado de Gleason) y características moleculares del tumor.
- Nivel de PSA sérico.
- Resultado estimado con diferentes opciones de tratamiento.
- Posibles complicaciones con cada enfoque terapéutico.
- Estado general del paciente, edad y comorbilidad, así como las preferencias individuales.

La evaluación inicial debe incluir la estadificación clínica basada en un examen rectal digital por un médico experimentado para evaluar el alcance de la enfermedad, el valor sérico de PSA, el grupo de puntuación/grado de Gleason en la biopsia inicial y el número y la extensión de la afectación en los cilindros de la biopsia. Esto permite la estratificación de los hombres en categorías de riesgo, según lo definido por la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN por sus siglas en inglés) última versión publicada en 2020 (108) [figura 3].

En algunos casos, esto también puede complementarse con las características moleculares (perfil genómico) del tumor (109). Una mayor comprensión de la biología

del cáncer de próstata ha llevado al desarrollo de ensayos moleculares en un esfuerzo por mejorar la toma de decisiones en hombres recién diagnosticados considerando la vigilancia activa y en hombres tratados con cirugía considerando la terapia adyuvante o el tratamiento de la recurrencia. La incertidumbre sobre el riesgo de progresión de la enfermedad podría reducirse si dichos ensayos moleculares proporcionaran información precisa y reproducible de pronóstico o predictiva más allá de la asignación de grupos de riesgo de la NCCN y las tablas y nomogramas de esperanza de vida disponibles actualmente. Estudios retrospectivos han demostrado que estos ensayos proporcionan información pronóstica independiente del grupo de estratificación de riesgo NCCN (108) o del grupo de evaluación del riesgo de próstata (CAPRA) (110).

Las directrices basadas en el consenso de la NCCN (108) establecen que las pruebas moleculares con Decipher, Oncotype DX Prostate, Prolaris o ProMark pueden considerarse en pacientes que son potenciales candidatos a vigilancia activa y están clasificados como bajo riesgo o riesgo intermedio favorable con una esperanza de vida mayor a 10 años.

Riesgo muy bajo	T1c MÁS
	Gleason Score ≤6, grupo 1 MÁS
	PSA < 10 ng/ml
	Menos de 3 cilindros de la biopsia negativos con ≤ 50% de afectación en cada cilindro MÁS
	Densidad de PSA < 0.15 ng/ml/g
Riesgo bajo	T1c-T2a MÁS
	Gleason Score ≤6, grupo 1 MÁS
	PSA < 10 ng/ml
Riesgo intermedio favorable	T2b-T2c Ó
	Gleason Score 3+4 (=7), grupo 2 Ó
	PSA 10-20 ng/ml
	Y afectación < 50% en cada cilindro de la biopsia
Riesgo intermedio desfavorable	T2b-T2c Ó
	Gleason Score 3+4 (=7), grupo 2 o Gleason Score 4+3 (=7), grupo 3 Ó
	PSA 10-20 ng/ml
	Afectación > 50% en cada cilindro de la biopsia
Riesgo alto	T3a Ó
	Gleason Score 8 (4+4, 3+5, 5+3), grupo 4 o Gleason Score 4+5 (=9), grupo 5 Ó
	PSA > 20 ng/ml
Riesgo muy alto	T3b-T4 Ó
	Gleason Score 5+4 (=9) o 5+5 (=10), grupo 5 Ó
	>4 cilindros de la biopsia con Gleason Score 8-10, grupo 4-5

Figura 3. Clasificación en grupos de riesgo de cáncer de próstata según la nueva clasificación de la NCCN v2.2020

Los estudios por imágenes [gammagrafía ósea (GGO), tomografía computarizada (TC) de abdomen y pelvis, resonancia magnética multiparamétrica (RMmp)] se utilizan selectivamente para evaluar la extensión extraprostática, la afectación ganglionar regional y/o las metástasis a distancia, dependiendo de la estadificación clínica inicial y la estimación del riesgo. Estas imágenes para identificar metástasis a distancia no se recomiendan rutinariamente para enfermedades de muy bajo o bajo riesgo (de acuerdo con el sistema de estadificación clínica descrito anteriormente), mientras que se recomienda para enfermedades más avanzadas (111). Para el resto de los grupos, donde sí se aconseja el estudio por imagen para una correcta estadificación, el grupo español de las tres sociedades de Uro-Oncología (URONCOR, GUO and SOGUG) recomienda, en el consenso que crearon en 2017, la realización de RMmp que ha demostrado un 77-80% de eficacia en la detección de afectación extracapsular (112), superior al tacto rectal y a otras técnicas de imagen para estadificación local. Según este consenso (con un nivel de evidencia 2b, nivel de recomendación A) se debe realizar RMmp y GGO para una correcta estadificación local, regional y a distancia (113).

El mismo grupo reserva la utilización de la tomografía por emisión de positrones con colina (PET/TAC colina) para la detección de afectación ganglionar o a distancia para pacientes con pruebas convencionales negativas, pero con alta sospecha de afectación clínica (113).

El PET con <sup>68</sup>Ga-PSMA (Galio68-Antígeno de membrana específico de la próstata, por sus siglas en inglés) es una novedosa técnica de imagen con mayor sensibilidad y especificidad que el PET/TAC con colina para diagnóstico de pacientes con cáncer de próstata. Sin duda, supone una importante mejora en las técnicas de imagen que cambiará la manera de proceder en estos pacientes (114), aunque, de momento, no es una realidad ni en nuestra práctica clínica habitual ni en nuestro medio.

La estadificación local del cáncer de próstata (T y N clínico) sigue siendo difícil, a pesar de los avances en el diagnóstico por imagen. En 1997 la American Joint Committee on Cancer (AJCC) adoptó la clasificación TNM para la estadificación del cáncer de próstata. Este sistema incorpora la extensión anatómica de la enfermedad basada en el tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis distantes (M). Tras diversas revisiones y modificaciones, en el 2017 se publicó la última actualización, hasta la fecha; la octava edición del TNM, estableciéndola como el sistema estándar de referencia para la estadificación de la enfermedad (115) [figura 4]. Incluye

cambios respecto a la anterior edición (107) Los más importantes son: la no subcategorización de pT2, ya que distintos estudios han demostrado que subdividirlo en distintas categorías (pT2a, pT2b y pT2c, según la lateralización de la enfermedad en próstata órgano confinada) como en ediciones anteriores no tiene valor pronóstico (116); y, sin embargo, incluye el grupo de grado histológico (basado en la puntuación de Gleason), además de conservar el valor de pronóstico de PSA sérico en el momento diagnóstico.

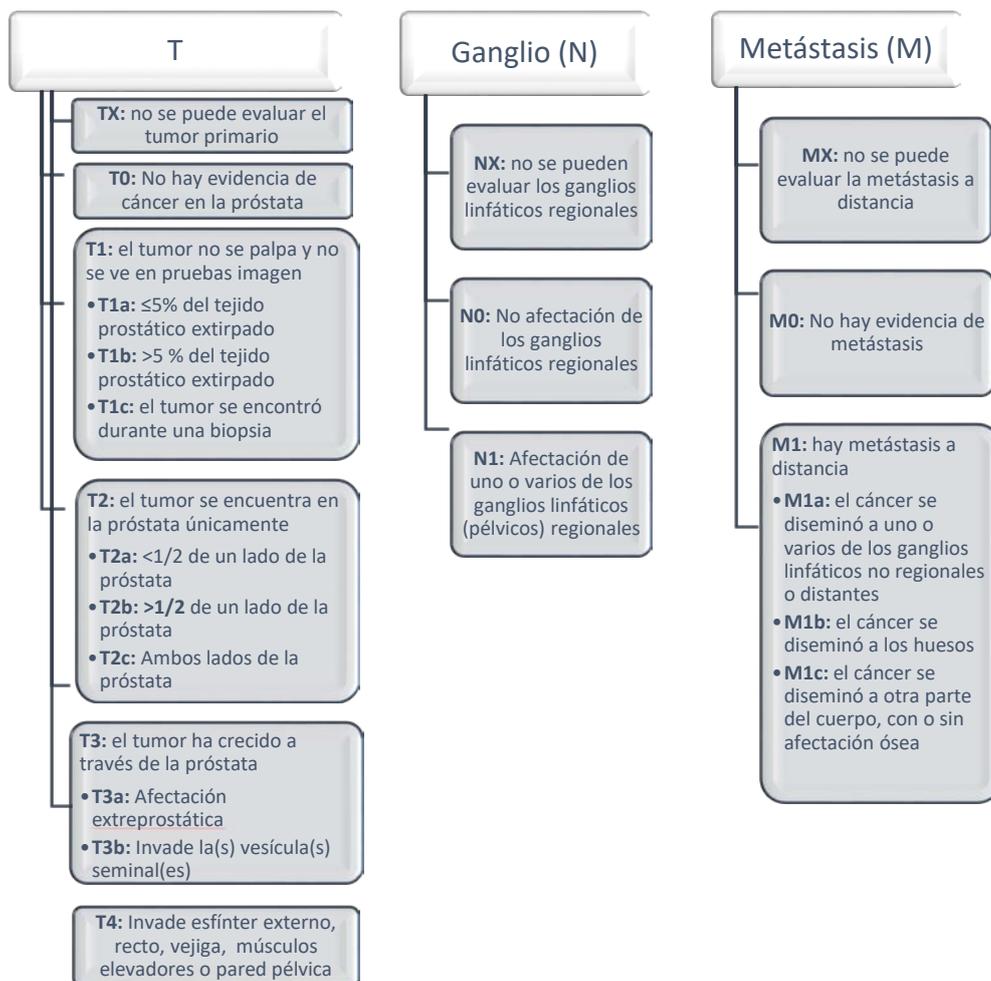


Figura 4. Octava clasificación TNM por la AJCC

## 1.4 Tratamiento según grupos de riesgo

El enfoque terapéutico dependerá del estadio, pero también de las condiciones de salud del paciente, su edad, la escala de Gleason, el valor de PSA y factores moleculares, sin dejar de tener en cuenta los efectos adversos y las preferencias personales de cada individuo.

La elección de la terapia depende de una decisión informada del paciente que incorpore conocimientos sobre las posibles ventajas y desventajas asociadas con los diferentes enfoques terapéuticos, teniendo en cuenta resultados oncológicos, efectos adversos y calidad de vida.

En la actualidad se están desarrollando y validando modelos que pueden utilizarse para predecir estimaciones individualizadas de recurrencia bioquímica y supervivencia cáncer específica (117-122) tras un tratamiento local definitivo, basado en factores clínicos.

Modelos como estos no tienen en cuenta pruebas genómicas o marcadores moleculares. Como se señaló anteriormente, se han desarrollado varios ensayos moleculares en un esfuerzo por mejorar la toma de decisiones en hombres recién diagnosticados de cáncer de próstata que consideran la vigilancia activa. La incertidumbre sobre el riesgo de progresión de la enfermedad podría reducirse si dichos ensayos proporcionaran información de pronóstico o predictiva precisa y reproducible más allá de la asignación de grupos de riesgo NCCN y nomogramas. En este sentido la NCCN indica que los pacientes con cáncer de próstata con enfermedad de riesgo intermedio bajo o favorable pueden beneficiarse o considerar el uso de estos test genéticos como Decipher, Oncotype DX Prostate, Prolaris, o ProMark durante la estratificación inicial del riesgo para seleccionar candidatos óptimos para la vigilancia activa (108).

Las siguientes opciones de tratamiento, que se basan en la estratificación del riesgo, son consistentes con las directrices de la Asociación Americana Urológica (AUA, por sus siglas en inglés) /Sociedad Americana de Oncología Radioterápica (ASTRO, por sus siglas en inglés) /Sociedad de Oncología Urológica (SUO, por sus siglas en inglés), que han sido ampliamente respaldadas por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, por sus siglas en inglés), y NCCN (108, 111, 123, 124).

- Cáncer de próstata clínicamente localizado de riesgo muy bajo por la NCCN (108): Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
  - Vigilancia activa. Se recomienda generalmente para los hombres con enfermedad de muy bajo riesgo y una esperanza de vida >10 años. Sin embargo, este enfoque se asocia con la necesidad de un seguimiento estrecho y muy bien protocolizado. Puede crear ansiedad significativa, haciendo que muchos pacientes elijan posteriormente una intervención definitiva, incluso, en ausencia de progresión de enfermedad.
  - Tratamiento radical. Pueden ser tratados con radioterapia externa, braquiterapia exclusiva o prostatectomía radical. El tratamiento hemiglandular o focal debería realizarse en el marco de un estudio clínico.
- Cáncer de próstata clínicamente localizado de riesgo bajo por la NCCN (108): Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
  - Vigilancia activa, con monitorización en serie e inicio de un tratamiento definitivo si hay evidencia de progresión
  - Tratamiento radical con radioterapia externa, braquiterapia exclusiva o prostatectomía radical
  - Se han propuesto otras opciones de tratamiento (crioterapia, ultrasonido de alta intensidad, terapia fotodinámica con láser intersticial), pero los datos obtenidos a largo plazo de seguimiento con peores resultados que las opciones previas han hecho que, de momento, no se considere como una opción de tratamiento estándar (125).

Los únicos datos que comparan directamente estas opciones de tratamiento en cáncer de próstata localizado de bajo y muy bajo riesgo provienen de un gran ensayo aleatorizado, Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT), que se llevó a cabo en el Reino Unido, en el que los pacientes fueron asignados aleatoriamente a la vigilancia activa, prostatectomía radical, o tratamiento de radioterapia exclusiva (126-127). No hubo diferencias significativas en tasas de supervivencia cáncer específicas a 10 años, ni en supervivencia global entre las diferentes modalidades de tratamiento. Sin embargo, hubo una mayor frecuencia de enfermedad metastática y progresión clínica con vigilancia activa.

- Cáncer de próstata clínicamente localizado de riesgo intermedio por la NCCN (108): Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
  - Radioterapia, que puede ser suministrado por una fuente de haz externo y/o braquiterapia. Debido al mayor riesgo de recurrencia o enfermedad diseminada, se recomienda añadir terapia de deprivación androgénica (ADT, por sus siglas en inglés) de manera neoadyuvante y concomitante a la radioterapia, como componente de un enfoque de modalidad combinada terapéutica.
  - Prostatectomía radical con linfadenectomía ganglionar pélvica, por vía laparoscópica o por laparotomía. Para pacientes tratados con prostatectomía radical, la presencia de factores de riesgo en la pieza quirúrgica puede ser una indicación para tratamiento radioterápico adyuvante.
  - La vigilancia activa es una opción para aquellos con enfermedad de riesgo intermedio favorable, pero se debe informar a los pacientes de que esto conlleva un mayor riesgo de desarrollar metástasis en comparación con el tratamiento definitivo. La vigilancia activa no está indicada para hombres con enfermedad de riesgo intermedio desfavorable.
  
- Cáncer de próstata clínicamente localizado de riesgo alto por la NCCN (108): Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
  - Radioterapia utilizando una fuente de haz externa combinada o no con braquiterapia. Se recomienda asociar ADT de forma neoadyuvante, concomitante y adyuvante a la radioterapia (18 a 36 meses) para disminuir el riesgo de diseminación y/o recurrencia
  - La prostatectomía radical con linfadenectomía de ganglios linfáticos pélvicos extendida es una opción para pacientes de alto riesgo sin infiltración de órganos/tejidos adyacentes. Al igual que lo comentado para pacientes prostatectomizados en riesgo intermedio, para los pacientes de alto riesgo tratados con prostatectomía radical, la presencia de características patológicas adversas en la pieza quirúrgica puede ser una

indicación para tratamiento adyuvante con radioterapia externa con o sin ADT.

- La ADT primaria por sí sola puede ser un enfoque razonable si los pacientes no son candidatos para la terapia definitiva local (comorbilidades, estado funcional, esperanza de vida...) y tienen síntomas locales, teniendo en cuenta que es a costa de una peor supervivencia global frente al resto de opciones anteriores curativas.
- Cáncer de próstata localmente avanzado o de riesgo muy alto por la NCCN (108):  
Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
- Radioterapia externa con o sin braquiterapia intersticial más ADT neoadyuvante, concomitante y adyuvante a la radioterapia.
  - La prostatectomía radical con linfadenectomía de ganglios linfáticos pélvicos extendida también puede ser una opción para pacientes de muy alto riesgo. Estos pacientes deberían estar muy seleccionados, según recomiendan el consenso del grupo español de Uro-Oncología (113) aunque no debería ser la opción elegida para estos pacientes si tenemos en cuenta el análisis retrospectivo con el mayor número de pacientes estudiado hasta la fecha (1809 pacientes) que encontró que las tasas de mortalidad cáncer específicas a cinco años fueron más bajas en aquellos tratados con radioterapia externa y braquiterapia intersticial en comparación con radioterapia externa exclusiva o prostatectomía radical (128).
  - Varias líneas de investigación están analizando el uso de terapias multimodales que incorporan terapia sistémica y radioterapia junto con cirugía para mejorar los resultados en pacientes con enfermedad localmente avanzada, de alto riesgo o metastática, ya sea a los ganglios linfáticos regionales o más extendido (129). Estos enfoques se deben considerar en el contexto de ensayo clínico.
- Cáncer de próstata localmente avanzado con afectación ganglionar regional (108):
- El tratamiento convencional suele ser radioterapia externa más ADT.
  - Sin embargo, para los hombres jóvenes con diseminación linfática regional mínima, la prostatectomía radical con linfadenectomía como

parte de una estrategia de combinación que incluye ADT y/o radioterapia postoperatoria puede considerarse una opción, pero con menos evidencia científica.

- Enfermedad metastática (108): Las opciones de tratamiento estándar para estos pacientes incluyen las siguientes:
  - Tradicionalmente ADT de forma exclusiva u orquiectomía bilateral era la opción elegida para estos pacientes. Sin embargo, en los últimos años han aparecido estudios que analizan la combinación de ADT con nuevas terapias androgénicas (abiraterona, apalutamida, enzalutamida) o docetaxel y debido a los excelentes resultados obtenidos deben considerarse estas combinaciones como el nuevo estándar de tratamiento (130-137) y, en casos seleccionados, añadir radioterapia local (138)
  - ADT más radioterapia estereotáxica extracraneal (SBRT, por sus siglas en inglés) para pacientes oligometastáticos

En pacientes diagnosticados de cáncer de próstata, pero no adenocarcinoma, si no histológicamente categorizado como carcinoma neuroendocrino de células grandes o de células pequeñas, el pronóstico es más sombrío (139). El manejo óptimo de estos pacientes no ha sido bien definido. Se requerirá investigación adicional para categorizar mejor este subconjunto de pacientes y definir el enfoque de tratamiento preferido. Para los pacientes con enfermedad localizada, el tratamiento es similar al de otros pacientes con enfermedad de alto riesgo o muy alto riesgo. Para los pacientes con enfermedad metastática, puede haber un mayor papel para la quimioterapia utilizando regímenes similares a los utilizados para el carcinoma de células pequeñas del pulmón.

## 1.5 Cáncer de próstata resistente a la castración

Aunque la mayoría de los casos de cáncer de próstata se diagnostican y tratan cuando la enfermedad está localizada, algunos hombres presentan metástasis en el momento diagnóstico y otros (en torno al 10-20%) las desarrollan durante los cinco años de seguimiento tras haber recibido un tratamiento definitivo (140). En muchos casos la única manifestación de enfermedad diseminada es un aumento del valor sanguíneo de PSA.

Los tratamientos de deprivación androgénica (bien a través de la castración quirúrgica o mediante castración química) han constituido el tratamiento de elección para el cáncer de próstata avanzado desde 1941. La deprivación androgénica química completa de primera línea se basa en la utilización de un análogo o agonista de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y un antiandrógeno.

Los agonistas de GnRH se unen a los receptores de GnRH en las células productoras de gonadotropina pituitaria, causando una liberación inicial de hormona luteinizante pituitaria (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH), lo que provoca un aumento posterior en la producción de testosterona a partir de células de Leydig testicular. Este aumento transitorio de la LH cuando se inicia la terapia de análogo de GnRH puede causar un aumento de la testosterona sérica, que puede estimular el crecimiento del cáncer de próstata. Este efecto llamado, conocido como efecto *flare*, puede causar un aumento de dolor óseo, obstrucción vesical u otros síntomas debido al cáncer de próstata. Éste se puede prevenir eficazmente con la terapia antiandrogénica, que bloquea el aumento de la testosterona sérica uniéndose a los receptores de andrógenos e inhibiendo competitivamente su interacción con la testosterona y la dihidrotestosterona. Los antiandrógenos solos no bloquean el eje hipotalámico-pituitario ya que los niveles de testosterona son normales o aumentan. Por tanto, es necesaria su combinación, ya que tras aproximadamente una semana de terapia con un fármaco antiandrógeno, los receptores de GnRH están regulados a la baja en las células productoras de gonadotropina, con una disminución en la producción pituitaria de LH y FSH. La caída de la LH sérica conduce a una disminución de la testosterona sérica para castrar los niveles en el plazo de tres a cuatro semanas tras el inicio del tratamiento. El tratamiento continuado mantiene la testosterona sérica a niveles de castración. Los agonistas de GnRH aprobados para la administración parenteral incluyen leuprolida, goserelina, triptorelina, buserelina e histrelina. Entre los antiandrógenos de primera generación se encuentran flutamida, bicalutamida y nilutamida.

Si bien esta aproximación terapéutica es altamente eficaz beneficiando a un 80-90% de los pacientes, la duración del beneficio es limitada en el tiempo estimándose su mediana en 18-24 meses, pasando el tumor entonces a una situación denominada cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

No están claros los mecanismos que impulsan la progresión del cáncer de próstata dependiente de andrógenos a CPRC, aunque la señalización continua del receptor de

andrógenos, a pesar del agotamiento de andrógenos circulantes y el bloqueo del receptor de andrógenos, se postula como una de las claves para el desarrollo del CPRC. Por este motivo, los tratamientos dirigidos frente a la vía de andrógenos pueden seguir siendo eficaces, aunque la enfermedad se conozca como resistente a la castración.

A lo largo del tiempo se han propuesto varias definiciones del CPRC. Del mismo modo, los criterios diagnósticos utilizados en los estudios clínicos han sido extremadamente heterogéneos (140). El Consenso de Expertos Europeos (141) definió a los pacientes con CPRC como hombres con niveles séricos de testosterona en rangos de castración con progresión sérica de PSA. El grupo español de expertos en tumores urológicos españoles añadieron progresión radiológica a la definición de CPRC (142). Y según un consenso posterior de URONCOR con un 96% de acuerdo el CPRC se definió por un PSA en aumento documentado ( $>2$  ng/ml) y/o progresión radiológica en hombres con niveles de testosterona de  $<50$  ng/dl ( $< 1,7$  nmol/l) (143).

Un aspecto importante para tener en cuenta es la presencia o no de metástasis en el contexto de CPRC ya que la historia natural de la enfermedad en este punto puede ser muy variable. Para aquellos cuya progresión de la enfermedad se manifiesta sólo por un aumento de PSA sérico (es decir, CPRC no metastático, CPRCM0), la historia natural de la enfermedad puede ser muy prolongada, lo que tiene implicaciones significativas para el momento y la elección de la terapia.

El manejo del CPRC típicamente implica el uso secuencial de tratamientos dirigidos a la vía del receptor de andrógenos, otras terapias hormonales alternativas, quimioterapia, terapia con radioisótopos e inmunoterapia, cuyo objetivo es prolongar supervivencia, minimizando las complicaciones y manteniendo la calidad de vida.

La secuenciación óptima de estas opciones en los hombres con CPRC no está definida en la actualidad. A continuación, se presentan las diferentes opciones terapéuticas y algunos de los ensayos clínicos que han propiciado su indicación en cada contexto.

- Continuación de la terapia de privación de andrógenos (ADT). La terapia de privación de andrógenos generalmente se continúa en la mayoría de los hombres con CPRC en combinación con otras terapias secundarias tras la progresión a la terapia inicial de bloqueo androgénico (144).

No hay estudios randomizados que aborden directamente la utilidad de la ADT continua en los hombres con CPRC. Sin embargo, un análisis multivariante de un estudio retrospectivo con 341 pacientes con CPRC tratados en cuatro ensayos clínicos, mostró una ventaja modesta en supervivencia (de dos a seis meses) para los hombres con CPRC que continuaron recibiendo supresión androgénica testicular (145).

- Tratamiento sistémico y secuenciación. En los últimos años se han investigado y desarrollado múltiples agentes que han mejorado la supervivencia global en CPRC, todos ellos administrados en combinación con ADT continuada. Pocos ensayos randomizados han comparado las distintas opciones de tratamientos uno frente a otro. Las distintas terapias sistémicas incluyen lo siguiente:

- Interferencia con la estimulación androgénica (abiraterona, enzalutamida, apalutamida, darolutamida).
- Quimioterapia basada en taxanos (docetaxel, cabazitaxel) o mitoxantrona.
- Inmunoterapia [vacuna sipuleucel-T y, para pacientes con alteración en la reparación del ADN (mismatch repair), pembrolizumab].
- Radiofármacos dirigidos a los huesos (Radio-223).
- Inhibidores la poliadenosina difosfato-ribosa polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés) para pacientes con mutación en genes de la reparación del ADN germinal o somático (por ejemplo, BRCA).
- Enfoques endocrinos más antiguos que pueden conservar la utilidad en situaciones seleccionadas. Sin embargo, para los hombres cuya terapia hormonal inicial incluía tanto un agonista de GnRH como un antiandrógeno, retirar el antiandrógeno es un primer paso razonable.

En ausencia de datos de grandes ensayos aleatorizados comparando estos fármacos entre sí, la secuenciación adecuada requiere la consideración de múltiples factores. Los factores que pueden influir en la elección del tratamiento son la localización y extensión de la enfermedad, especialmente, y el tratamiento sistémico previo, la vía y la frecuencia de administración del fármaco elegido, los efectos secundarios, costo, comorbilidades y preferencias del paciente, además de estudio de determinadas alteraciones genéticas, nombradas anteriormente.

### 1.5.1 Terapia sistémica

#### a) Interferencia con la estimulación androgénica

Abiraterona. Los andrógenos producidos en los testículos, las glándulas suprarrenales y las propias células tumorales pueden producir la señalización autocrina/paracrina y fomentar la progresión del tumor. Abiraterona actúa inhibiendo de manera irreversible los productos del gen del citocromo P450, familia 17 (CYP17) (incluyendo 17,20-liasa y 17-alfa-hidroxilasa). Al hacerlo, bloquea la síntesis de andrógenos en el tumor, en los testículos y en las glándulas suprarrenales. Es un inhibidor de la síntesis de andrógenos.

Sin embargo, la inhibición de la enzima 17-alfa-hidroxilasa también disminuye el cortisol, lo que produce un aumento compensatorio de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que está mediada por una respuesta hipotalámica a la inhibición suprarrenal parcial. El aumento de la liberación de ACTH puede causar un aumento en la producción de mineralocorticoides suprarrenales, que pueden ser responsables de producir hipertensión e hipopotasemia. Para disminuir estos efectos por exceso de mineralocorticoides, abiraterona debe de ser administrada de manera conjunta con prednisona, lo que reduce la estimulación mediada por ACTH de las glándulas suprarrenales.

En dos ensayos aleatorizados fase III, abiraterona más prednisona demostró un aumento en supervivencia global en comparación con placebo más prednisona en hombres con CPRC metastáticos. El primero de ellos para pacientes que previamente habían sido tratados con docetaxel (146) y, el segundo, en CPRC metastáticos como tratamiento de primera línea, en aquellos que todavía no habían sido tratados con quimioterapia (147).

Enzalutamida, apalutamida y darolutamida. Enzalutamida, apalutamida y darolutamida son agentes administrados por vía oral que actúan en múltiples sitios de la vía de señalización del receptor de andrógenos, incluido el bloqueo de la unión de andrógenos a su receptor, inhibición de la translocación nuclear del receptor de andrógenos, y la inhibición de la asociación del receptor androgénico con ADN nuclear. Se consideran antagonistas del receptor de andrógenos. Apalutamida y enzalutamida tienen un mecanismo de acción y un perfil de eficacia muy similares. Darolutamida es un antagonista del receptor de andrógenos con una estructura molecular distinta que le confiere baja penetración de la barrera hematoencefálica y baja afinidad por los receptores

de ácido gamma-aminobutírico tipo A (que se consideran responsables de la tendencia de otros antagonistas de los receptores de andrógenos a inducir convulsiones).

A diferencia de abiraterona, ninguno de estos tres fármacos requiere tratamiento simultáneo con esteroides.

En el CPRC metastático enzalutamida se ha comparado con placebo en dos ensayos aleatorizados fase III. Al igual que en abiraterona, uno de ellos fue en hombres que habían sido tratados previamente con docetaxel (148) y el otro en aquellos que todavía no habían recibido quimioterapia (149). La supervivencia global fue superior, de manera estadísticamente significativamente, en ambos ensayos.

En el CPRC no metastático, al menos tres ensayos aleatorizados fase III controlados con placebo demuestran la eficacia de apalutamida (150), enzalutamida (151) y darolutamida (152) en el tratamiento de hombres con CPRC no metastático con tiempo de duplicación de PSA menor de 10 meses y, por este motivo, han sido aprobados por la FDA para su uso en este contexto.

Ninguno de estos cuatro fármacos se ha comparado directamente entre sí en ensayos fase III randomizados. La elección del agente se basa en posibles efectos secundarios, comorbilidades y disponibilidad. No parece haber ningún beneficio para combinar abiraterona con enzalutamida. Esta combinación se abordó en el ensayo fase III ALLIANCE A031201 (153). En un informe preliminar presentado en la reunión anual de la ASCO de 2019, la terapia combinada no mejoró la supervivencia global ni disminuyó cifras de PSA, pero sí que aumentó, en cambio, las tasas de hipertensión arterial de grado 3 o 4, astenia, hipertransaminemia e hipopotasemia.

Sólo hay datos limitados sobre la actividad de enzalutamida en pacientes que han sido tratados previamente con abiraterona y sobre la actividad de abiraterona después del tratamiento con enzalutamida, pero los datos disponibles sugieren que el valor clínico del “switch” es limitado (154,155). Recientemente se ha publicado un ensayo clínico fase II (156) que sugiere que el uso de una estrategia de secuenciación de acetato de abiraterona seguida de enzalutamida proporciona el mayor beneficio clínico en terapia de secuenciación en CPRC metastático.

#### b) Inmunoterapia

Sipuleucel-T. Se trata de una vacuna de células dendríticas que se prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica obtenidas por leucoféresis. Estas células están expuestas ex vivo a un nuevo inmunogen de proteína recombinante que consiste en

fosfatasa ácida prostática (PAP) fusionada con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Estas células activadas se infunden de nuevo en el paciente aproximadamente tres días después de su preparación. Está diseñada para mejorar la respuesta inmune de los linfocitos T a la PAP. En ensayos aleatorizados en pacientes con CPRC metastático mínimamente sintomático, sipuleucel-T prolongó la supervivencia global en comparación con placebo, reduciendo la mortalidad en un 22% (157). No hay datos sobre su eficacia en hombres con CPRC no metastático o en aquellos con enfermedad más avanzada (metástasis viscerales), ni en pacientes con enfermedad metastática sintomática. El tratamiento está contraindicado en pacientes que toman corticoesteroides u opioides.

Aunque sipuleucel-T prolongó la supervivencia global, no aumentó significativamente la supervivencia libre de progresión ni afectó al PSA sérico. Por lo tanto, evaluar el impacto de la terapia en un paciente individual puede ser difícil o imposible. La ausencia de parámetros objetivos para juzgar si un paciente individual se está beneficiando o no de la terapia vacunal plantea una dificultad importante para determinar cuándo considerar ineficaz el sipuleucel-T e iniciar un tratamiento alternativo.

Otras opciones de inmunoterapia activa (vacunas terapéuticas) pretenden potenciar, de igual modo, el sistema inmunológico frente a la enfermedad ya existente para que sea capaz de destruir las células tumorales, como las vacunas de combinaciones virales, vacunas de células completas y vacunas basadas en antígenos (158).

Actualmente, Provenge® (sipuleucel-T, vacuna autóloga de células dendríticas) es la única vacuna que se encuentra comercializada desde abril de 2010, aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer de próstata metastático asintomático o mínimamente sintomático resistente a la castración. El resto de vacunas se encuentran en fase de investigación. El ensayo fase III (159) de la vacuna de recombinación de virus (Prostvac-VF®) no mostró beneficio en supervivencia global y la investigación sobre la vacuna de células completas GVAX® se encuentra detenido en fase III por presentar una alta mortalidad en el grupo intervención (160).

**Pembrolizumab.** Anticuerpo frente a PD-1, de manera que su empleo inhibe la interacción PD-L1/PD-1.

En mayo de 2017, la FDA aprobó pembrolizumab para el tratamiento de una variedad de tumores sólidos avanzados (incluyendo adenocarcinoma de próstata) que tienen altos niveles de inestabilidad en microsatélites (MSI-H, por sus siglas en inglés) o que tienen alterada la reparación del ADN por falta de coincidencia “mismatch repair”

(dMMR), y que progresaron a los tratamientos previos y para los cuales no hay opciones de tratamiento alternativo satisfactorio.

Los cánceres de próstata intraductales y de alto grado (grupo de grado 5) tienen una mayor frecuencia de dMMR (161-162) y debería incluirse su estudio en este tipo de tumores para identificar pacientes que podrían beneficiarse de esta terapia inmunológica.

MSI-H o dMMR pueden indicar la presencia del síndrome de Lynch, afección hereditaria que predispone a varios tipos de tumores, particularmente cáncer colorrectal, pero también posiblemente a cáncer de próstata (163). Dado que el síndrome de Lynch es más frecuente de lo que se pensaba anteriormente, todos los pacientes con un cáncer de próstata MSI-H/dMMR deben ser referidos para la evaluación genética germinal del síndrome de Lynch, independientemente de los antecedentes familiares (164).

#### c) Quimioterapia

Los taxanos son los únicos agentes de quimioterapia citotóxicos que han prolongado significativamente la supervivencia global en ensayos clínicos en hombres con CPRC.

Docetaxel. El empleo de este fármaco administrado cada tres semanas en combinación con prednisona diaria (5 mg dos veces al día) aumenta la supervivencia global de manera estadísticamente significativa en comparación con mitoxantrona más prednisona en el ensayo TAX 327 fase III (165). En base a estos resultados, docetaxel más prednisona se ha convertido en el régimen inicial estándar cuando la quimioterapia está indicada en pacientes con CPRC metastáticos (166).

Cabazitaxel. Un derivado taxano sintético que se desarrolló para pacientes que progresaban a docetaxel. En un ensayo fase III, cabazitaxel más prednisona demostró un aumento significativo en supervivencia global en comparación con mitoxantrona más prednisona en pacientes que habían progresado a docetaxel (167).

En el ensayo FIRSTANA (168), se comparó la actividad de cabazitaxel (20 o 25 mg/m<sup>2</sup>) frente a docetaxel en tratamiento de primera línea de CPRC metastático. Los tres brazos también recibieron prednisona oral diaria. El estudio demostró la no inferioridad en supervivencia global de cabazitaxel frente a docetaxel y demostró que cabazitaxel tenía menor incidencia de neuropatía periférica, edemas, alopecia y alteraciones ungueales que con docetaxel.

Mitoxantrona. Primer agente quimioterápico aprobado para su uso en pacientes con CPRC basado en mejoría sintomática paliativa y no en aumento de supervivencia

global (169-170). Su uso ahora se limita generalmente a los pacientes que requieren quimioterapia y han progresado o no son candidatos para quimioterapia con taxanos.

Inhibidores de la poliadenosina difosfato-ribosa polimerasa (PARP). Pacientes con CPRC metastáticos con mutaciones genéticas en genes de reparación del ADN germinal o somático (por ejemplo, BRCA, CHEK2, ATM, PALB2, FANCA, o RAD51D) pueden responder al tratamiento con un inhibidor de PARP (171). Los datos parecen prometedores pero su uso todavía se considera investigacional. Aunque recientemente se han publicado los resultados de un fase III que abren la puerta al uso de olaparib para pacientes con CPRC metastáticos que hayan progresado a enzalutamida o abiraterona y que tengan alteración en genes de reparación de ADN (172). Todos los pacientes con una mutación germinal o somática en un gen de reparación del ADN de recombinación homóloga, especialmente si la mutación es en BRCA2, deberían ser incluidos en ensayos clínicos que evalúen los inhibidores de PARP. Si la participación en un ensayo clínico no es factible o los ensayos no están disponibles, su uso fuera de indicación podría considerarse individualizando el caso.

#### d) Radiofármacos

Radio-223. Radiofármaco emisor de partículas alfa que tienen afinidad por los huesos. La descomposición radiactiva del radio-223 permite la deposición de radiación de alta energía a una distancia mucho más corta que la de los radioisótopos emisores de partículas beta, minimizando así la toxicidad para la médula ósea normal y otros órganos a riesgo cercanos.

En un ensayo de fase III, el tratamiento con radio-223 fue bien tolerado y aumentó tanto la supervivencia global como el tiempo hasta el primer evento óseo sintomático relacionado en pacientes con metástasis óseas sintomáticas y sin metástasis viscerales conocidas (173).

La combinación con otros fármacos de momento no está establecida. En el ensayo fase III ERA223 (174) se combinó con abiraterona, pero se levantó el ciego de forma prematura tras observarse más fracturas y muertes en el grupo de combinación, por lo que su utilización de manera conjunta no se recomienda.

#### e) Otros enfoques endocrinos

Existen enfoques endocrinos más antiguos que pueden conservar la utilidad en pacientes seleccionados, pero éstos no fueron evaluados adecuadamente en ensayos

aleatorios o sus resultados fueron inferiores a los conseguidos con las terapias presentadas anteriormente. Sin embargo, para los hombres cuya terapia hormonal inicial incluía tanto un agonista de la GnRH como un antiandrógeno, retirar el antiandrógeno es un primer paso razonable.

Suspensión de antiandrógenos. Para pacientes tratados con bloqueo androgénico completo, la primera maniobra es retirar el antiandrógeno, manteniendo únicamente el análogo de GnRH, maniobra que puede producir una respuesta clínica o bioquímica (descenso de PSA) (175). Por lo general, no se debe iniciar otra terapia hasta que haya transcurrido el tiempo adecuado para evaluar una posible respuesta a esta suspensión de antiandrógeno.

Ketoconazol. Agente antifúngico que inhibe la síntesis de andrógenos suprarrenales. El ketoconazol también tiene un efecto citotóxico directo sobre las células de cáncer de próstata. Su acción antitumoral es rápida, consigue niveles de testosterona en rangos de castración bioquímica en 24 horas. El beneficio de este fármaco se demostró en el ensayo fase III CALGB 9583 (176). Sin embargo, sus efectos adversos (náuseas, vómitos, erupción cutánea, astenia, disnea, ginecomastia, insuficiencia adrenal, hepatopatía...) y las múltiples interacciones farmacológicas limitan mucho su uso y rara vez se emplea en este contexto. Por esto, las agencias reguladoras no recomiendan su uso. Se emitió una alerta por el comité de medicamentos de uso humano (CHMP, por sus siglas en inglés) recomendando la suspensión de la comercialización de los medicamentos de administración sistémica que contienen ketoconazol. A partir de esta alerta europea la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) recomienda no iniciar nuevos tratamientos con ketoconazol sistémico y revisar los tratamientos en curso, quedando su uso reservado para casos de síndrome de Cushing previa solicitud especial.

Glucocorticoides. Prednisona, dexametasona e hidrocortisona reducen la producción pituitaria de ACTH, lo que conlleva a una supresión de la esteroidogénesis suprarrenal, incluyendo los andrógenos suprarrenales. Varios estudios (177-179) han demostrado una mejoría subjetiva y objetiva en pacientes con CPRC que reciben glucocorticoides. Sin embargo, el perfil de toxicidad a largo plazo ha limitado mucho su empleo.

Estrógenos y progestágenos. Los estrógenos inhiben la liberación de GnRH del hipotálamo, suprimiendo así la liberación de LH y reduciendo así la producción testicular de testosterona.

Diethylstilbestrol (DES) a una dosis de 1 mg/día es útil en algunos pacientes (180). Dosis superiores (5mg/día) ya no se utilizan debido al mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. DES es barato, pero su disponibilidad está limitada en todo el mundo.

El acetato de megestrol es una versión sintética de progesterona que puede tener su papel en este contexto (181) aunque rara vez se utiliza ya que sólo tiene actividad limitada y se ha asociado con complicaciones como trombosis venosa profunda.

## 1.6 Enzalutamida

### 1.6.1 Mecanismo de acción de enzalutamida

Antes de explicar el mecanismo de acción de enzalutamida, merece la pena describir el receptor de andrógenos y explicar su forma de activación, para así comprender mejor el mecanismo de acción de enzalutamida

El receptor de andrógeno (AR, por sus siglas en inglés) es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los receptores hormonales nucleares (182). Entre sus funciones se encuentra la de regular la expresión de genes críticos (como el PSA y el gen de fusión Tmprss2-ets, entre otros) en una forma ligando-dependiente. El principal ligando del AR es la DHT. La unión de la DHT al dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés) del AR promueve la dimerización del AR y su translocación nuclear y va a estimular la actividad transcripcional del receptor. La interacción AR con el ADN induce la expresión o represión de diferentes genes según la situación y regula múltiples funciones celulares como proliferación, apoptosis, migración, invasión y diferenciación (183).

Enzalutamida es un inhibidor del AR de segunda generación, que se dirige directamente al receptor y actúa en los tres pasos de su vía de señalización (184) [figura 5]. Por un lado, inhibe la unión de andrógenos al receptor por lo que al no producirse dicha unión no se induce un cambio conformacional que desencadena la activación del receptor. Previene, además, la translocación nuclear del AR, que es un paso esencial en la regulación de la transcripción de determinados genes específicos, e impide la unión del AR al ADN que es esencial para la modulación de expresión de los genes.

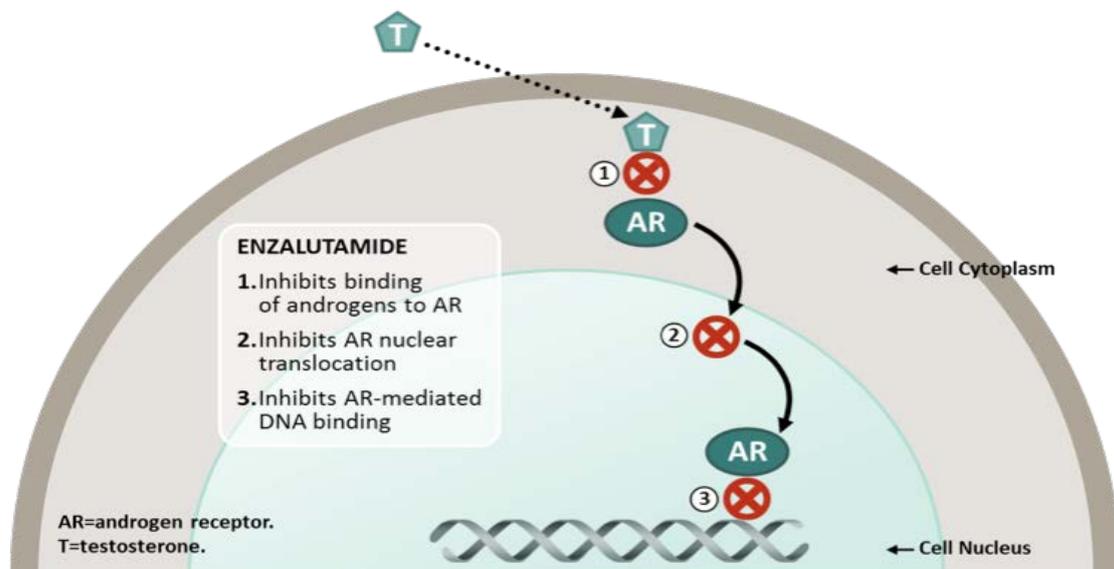


Figura 5. Mecanismo de acción de enzalutamida

### 1.6.2 Farmacocinética

Enzalutamida se administra de forma oral. La dosis recomendada es de 160 mg (cuatro cápsulas de 40 mg) en una sola dosis diaria. Se puede administrar con o sin alimentos. Su absorción oral se estima en algo menos del 85%. Las concentraciones máximas en plasma se observan pasadas 1 o 2 horas de su administración. El aclaramiento es primariamente por metabolismo hepático. Se metaboliza por el citocromo P450 2C8 (CYP2C8) y en menor medida por el citocromo P450 3A4/5 (CYP3A4/5). Existen dos metabolitos mayores en el plasma humano: N-desmetil enzalutamida (activo) y un derivado del ácido carboxílico (inactivo). El metabolito activo es tan activo como enzalutamida y circula en una concentración plasmática similar. Los estudios en roedores indican que tanto enzalutamida como su metabolito activo pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Bajo condiciones de uso clínico, enzalutamida es un inductor fuerte de CYP3A4 y un inductor moderado de los citocromos P450 2C9 y 2C19 (CYP 2C9 y CYP2C19, respectivamente). Su eliminación se produce a través de la orina en un 71% (principalmente como metabolito inactivo, con trazas de enzalutamida y su metabolito activo) y un 13,6% se recupera en las heces (un 0,39% de la dosis como enzalutamida pura) (185).

### 1.6.3 Ensayos clínicos con enzalutamida en CPRC metastáticos

#### Estudios Fase I-II

En 2010 se publica un estudio fase I-II (186) con 140 pacientes con cáncer de próstata resistentes a la castración metastáticos donde los pacientes podían haber recibido previamente quimioterapia. El objetivo principal era identificar la seguridad y la tolerabilidad de MDV3100 (posteriormente conocido como enzalutamida) y establecer la dosis máxima tolerada, que fue de 240 mg al día vía oral. En la parte fase I se observó actividad del fármaco en todos los niveles de dosis. La disminución de PSA mayor del 50% se observó en el 56% de los pacientes. La mediana de tiempo a la progresión radiológica se sitúa en 47 semanas. La astenia fue el evento adverso, grado 3-4, más común y se vio que era dependiente de la dosis, generalmente se resolvió tras la reducción de la misma. Todos estos resultados llevaron a que se explorara su actividad a una dosis de 160 mg en estudios fase III.

Enzalutamida 160 mg al día comparó su eficacia frente a bicalutamida (antiandrógeno no esteroideo) 50 mg al día en un ensayo clínico fase II, aleatorizado, randomizado 1:1 para pacientes con CPRC metastáticos asintomáticos o mínimamente sintomáticos (187). Ambas terapias se combinaron con bloqueo hormonal [castración quirúrgica (orquiectomía) o química (agonista o antagonista de GnRH)]. Se randomizaron 375 pacientes (184 recibieron enzalutamida y 191 bicalutamida). Antes de finalizar el estudio el 68% de los pacientes del grupo de enzalutamida y el 88% del grupo de bicalutamida tuvieron que suspender el tratamiento por progresión de la enfermedad. La mediana de supervivencia libre de progresión (objetivo principal del estudio) fue superior en el brazo de enzalutamida [15,7 meses (IC 95%, 11,5–19,4)] frente al brazo de bicalutamida [5,8 meses (IC 95%, 4,8–8,1)] con una disminución de riesgo de progresar del 56% a favor de enzalutamida [HR 0,44 (IC 95%, 0,34–0,7);  $p < 0,0001$ ]. Los dos obtuvieron un perfil de toxicidad similar, aunque efectos adversos serios (G3 o superior) fueron más frecuentes en el grupo de enzalutamida (31% vs 23%), siendo el más frecuente hipertensión (7% vs 4%). Estos resultados avalaron el uso de enzalutamida frente a bicalutamida en pacientes con CPRC metastáticos.

### Estudios Fase III

El estudio AFFIRM (148) fue un estudio internacional fase III, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo que valoró el papel de enzalutamida en pacientes con CPRC metastáticos asintomáticos o levemente sintomáticos que habían sido tratados previamente con uno o dos regímenes de quimioterapia, siendo docetaxel uno de los quimioterápicos utilizados. 1199 pacientes fueron aleatorizados de forma 2:1 a recibir enzalutamida 160 mg al día (800 pacientes) vs placebo (399 pacientes). Se incluyeron estudios de calidad de vida. Su objetivo principal fue el análisis de supervivencia global, definido como el tiempo desde la aleatorización a la muerte por cualquier causa. En 2012 se publican sus datos con un seguimiento medio de 14,4 meses. La supervivencia global fue de 18,4 meses (IC 95%, 17,3- no alcanzado) entre los pacientes tratados con enzalutamida frente a 13,6 meses (IC 95%, 11,3-15,8) entre los pacientes que recibieron placebo (figura 6). En el momento del análisis intermedio preespecificado en el estudio, con 520 muertes, se evidenció una reducción del riesgo de muerte del 37% a favor de enzalutamida (HR 63%: IC 95%, 0,53-0,75:  $p < 0,001$ ) por lo que en este momento el estudio se paralizó y se abrió el ciego para que los pacientes del grupo placebo comenzasen tratamiento con enzalutamida. Esta ganancia en supervivencia global fue consistente entre los diferentes subgrupos analizados: edad, dolor basal, región geográfica y tipo de progresión en el momento de la inclusión en el estudio. La superioridad de enzalutamida sobre placebo se demostró, igualmente, en los objetivos secundarios analizados: reducción de PSA (54% vs 2%;  $p < 0,001$ ), tasa de respuesta en tejido blando (29% vs 4%;  $p < 0,001$ ), calidad de vida medida por la escala FACT-P (43% vs 18%;  $p < 0,001$ ), tiempo a la progresión por PSA (8,3 vs 3 meses;  $p < 0,001$ ; HR= 0,25), supervivencia libre de progresión radiológica (8,3 vs 2,9 meses; HR= 40;  $p < 0,001$ ), y tiempo hasta la aparición del primer suceso esquelético (16,7 vs 13,3 meses; HR=0,69;  $p < 0,001$ ). Enzalutamida fue bien tolerada, la frecuencia de efectos adversos fue similar a la de los pacientes tratados con placebo (98% en ambos grupos) pero la frecuencia de efectos adversos de toxicidad grado 3-4 fue superior en el grupo placebo (53% vs 45%).

Astenia, diarrea y sofocos fueron los efectos adversos más comunes y ligeramente más altos en el grupo de la enzalutamida. Convulsiones fueron notificadas en cinco pacientes (0,6%) del grupo de enzalutamida.

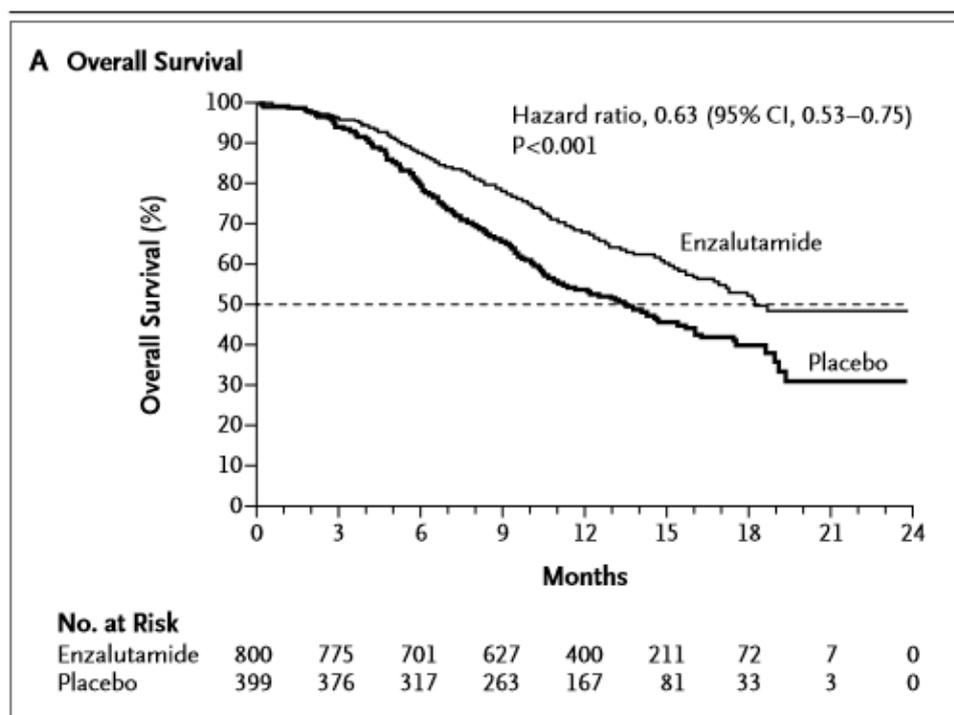


Figura 6. Representación gráfica de Supervivencia global en estudio AFFIRM con el estimador de supervivencia Kaplan-Meier

Tras los buenos resultados obtenidos con enzalutamida en pacientes con CPRC metastáticos, los investigadores del estudio PREVAIL (149) se plantearon el papel de Enzalutamida en pacientes con CPRC metastáticos, pero en primera línea, previo a tratamiento con quimioterapia. Para ello diseñaron un estudio fase III, internacional, aleatorizado, doble ciego, donde se comparaba la eficacia de Enzalutamida 160 mg al día frente a placebo en este grupo de pacientes. Se incluyeron un total de 1717 pacientes (872 pacientes en el grupo de enzalutamida y 845 pacientes en el grupo control). Los resultados del estudio se publicaron en 2014. Los objetivos principales del estudio fueron la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión radiológica. El tratamiento se mantuvo hasta que apareció cualquier efecto adverso inaceptable, progresión radiológica confirmada o inicio de segunda línea de tratamiento. La progresión de PSA como criterio único no se consideró como motivo de suspensión de tratamiento. Al igual que ocurrió en el estudio AFFIRM, este estudio también se detuvo tras el análisis intermedio planificado cuando se habían notificado 540 muertes, debido al claro beneficio mostrado en el grupo de tratamiento activo. Tras 12 meses de seguimiento, la tasa de pacientes sin progresión radiológica fue de un 65% en los pacientes que fueron tratados con enzalutamida y un 14% entre los que fueron tratados con placebo, con una reducción de riesgo de progresión radiológica del 81% (HR: 0,19; IC 95% 0,15 -0,23; p<0,001). La

reducción del riesgo de muerte en el grupo de enzalutamida fue de un 29% (HR: 0,71; IC 95% 0,6 -0,84; p<0,001). Con una mediana de seguimiento de 22 meses el grupo de enzalutamida registró menos muertes que el grupo tratado con placebo (28% vs 35%). Estos efectos en supervivencia libre de progresión radiológica y en supervivencia global fueron consistentes entre los distintos subgrupos analizados. Los resultados de eficacia de enzalutamida en las variables secundarias analizadas (tiempo a inicio de quimioterapia, tiempo a una bajada en calidad de vida, tiempo a la aparición de primer suceso esquelético, tiempo a progresión por PSA, respuesta por PSA < 50% y <90% y respuesta objetiva en tejidos blandos) también fueron superiores de manera estadísticamente significativa (p <0.01 en todas ellas)

El perfil de tolerancia y efectos secundarios fue parecido a los resultados del estudio AFFIRM. Un paciente de cada rama de estudio presentó convulsiones como efecto secundario. La incidencia de hipertensión arterial en el brazo de enzalutamida fue superior, llegando a un 7% de grado 3-4.

Este estudio demostró la actividad clínica de enzalutamida en pacientes con CPRC metastáticos que no han recibido tratamiento previo con quimioterapia, demostrando su superioridad frente a placebo en los dos objetivos principales del estudio (supervivencia global y supervivencia libre de progresión radiológica) [figura7]. Las guías actuales internacionales NCCN ofrecen enzalutamida como uno de los tratamientos recomendado para el CPRC metastático (categoría 1 en su grado de recomendación tanto si el paciente presenta enfermedad visceral como si no la presenta) (108).

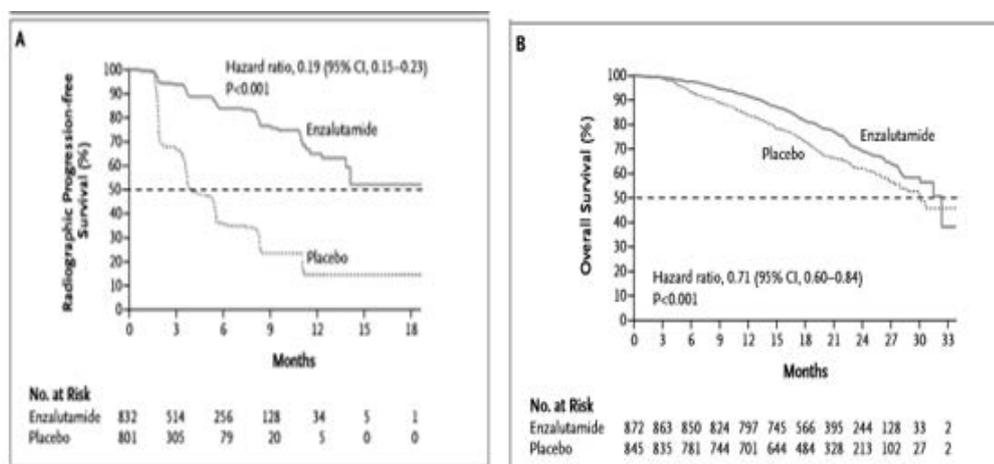


Figura 7. Representaciones gráficas de supervivencias Kaplan–Meier de los dos objetivos primarios del estudio PREVAIL. A: Supervivencia Libre de Progresión Radiológica. B: Supervivencia Global

## 1.6.4 Ensayos clínicos con Enzalutamida en CPRC no metastáticos

### Estudios Fase I-II

En el estudio Fase II randomizado, doble ciego, STRIVE, se compara la eficacia y seguridad de enzalutamida frente a bicalutamida en 396 pacientes con CPRC no metastático (139 pacientes) o metastático (257 pacientes). Se aleatorizaron al azar con asignación 1:1 a recibir tratamiento con enzalutamida 160 mg/día (198 pacientes) o con bicalutamida 50 mg/día (198 pacientes). La terapia de privación androgénica continuó en ambos brazos. La variable principal del estudio fue la supervivencia libre de progresión (SLP). Enzalutamida demostró reducir el riesgo de progresión o muerte en un 76% comparado con bicalutamida (HR 0.24; IC 95% 0,18- 0,32;  $P < 0,001$ ). El efecto beneficioso de enzalutamida se observó tanto en pacientes metastáticos como no metastáticos, y su tasa de efectos adversos fue comparable a otros ensayos clínicos con enzalutamida. La mediana de SLP en pacientes CPRC no metastáticos tratados con enzalutamida no se alcanzó en el momento de la publicación. La mediana de SLP para pacientes tratados con bicalutamida fue de 8,6 meses (HR 0.24; IC 95% 0,14- 0,42). En el subgrupo de CPRC metastáticos, las medianas de SLP en pacientes tratados con enzalutamida y bicalutamida fueron de 16,5 meses y 5,5 meses, respectivamente (HR 0.24; IC 95% 0,17-0,34). Estos hallazgos publicados en 2016 (188) condujeron a realizar estudios fase III para el subgrupo de pacientes con CPRC no metastáticos.

### Estudios Fase III

1401 pacientes con CPRC no metastático y con un tiempo de duplicación de PSA máximo de 10 meses fueron incluidos y analizados en el ensayo PROSPER (151). Ensayo fase III, doble ciego, randomizado con una asignación 2:1, donde enzalutamida 160mg/día (933 pacientes) se comparaba con placebo (468 pacientes). La variable principal del estudio fue la supervivencia libre de metástasis (SLM), variable aceptada como buena subrogada de supervivencia global en cáncer de próstata tras los resultados de un estudio con más de 28000 pacientes con cáncer de próstata (189). La mediana de supervivencia libre de metástasis fue de 36,6 meses en el grupo de enzalutamida frente a 14,7 meses en el grupo placebo con una reducción de riesgo de metástasis o muerte de 71% (HR 0,29; IC 95% 0,24-0,35;  $P < 0,001$ ) [figura 8]. Enzalutamida también mostró su superioridad en el resto de las variables secundarias analizadas: tiempo hasta uso de siguiente tratamiento antineoplásico tras progresión (39,6 meses frente a 17,7 meses,

P<0.001), tiempo hasta la progresión del PSA (37,2 meses frente a 3,9 meses, P<0.001). En el momento del primer análisis intermedio planificado, la mediana de supervivencia global no se había alcanzado en ninguno de los dos brazos del estudio. Hasta ese momento habían fallecido 103 pacientes (11%) del grupo de enzalutamida y 62 pacientes (13%) en el grupo de placebo. Los efectos adversos de grado 3 o superior ocurrieron en el 31% de los pacientes que recibieron enzalutamida, en comparación con el 23% de los que recibieron placebo, hallazgos consistentes con el perfil de seguridad establecido de enzalutamida. Recientemente, en junio 2020, se publican los datos de supervivencia global del estudio PROSPER (190) donde se demuestra que enzalutamida aumenta la supervivencia global en 11 meses comparada con placebo, de manera estadísticamente significativa en CPRC no metastáticos y que su empleo reduce el riesgo de muerte en un 27% (HR 0,73; IC95% 0,61- 0,89; P = 0,001) [figura 9].

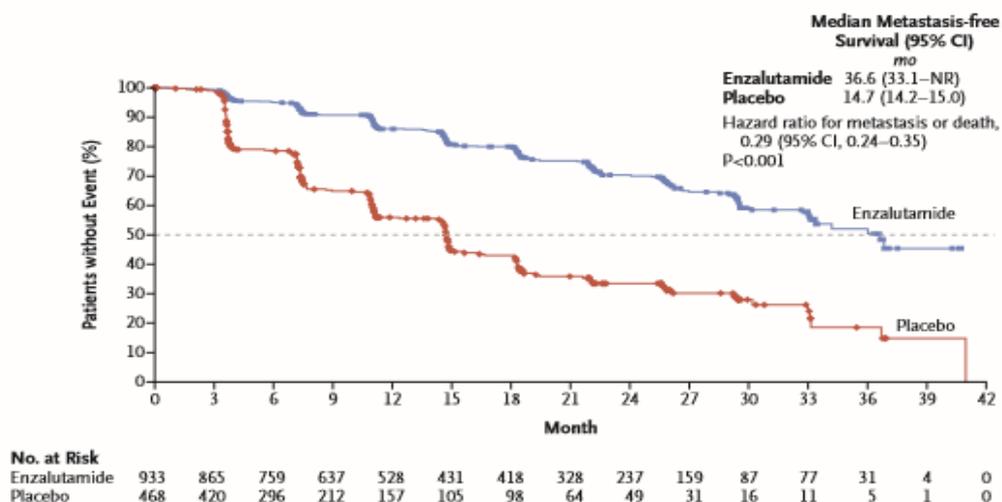


Figura 8. Curvas de estimación Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis en estudio PROSPER

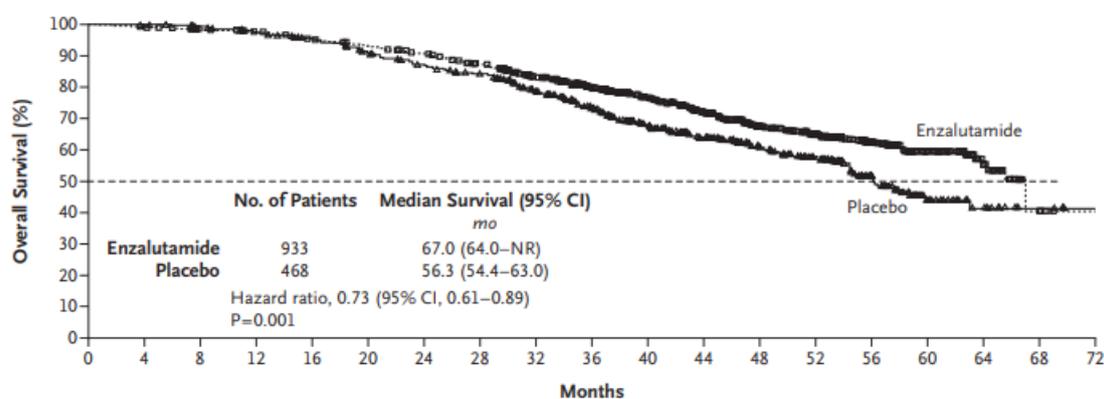


Figura 9. Curvas de estimación Kaplan-Meier de supervivencia global en estudio PROSPER

## 1.6.5 Ensayos clínicos con enzalutamida en cáncer de próstata hormonosensible (CPHS)

### Estudios Fase I-II

Un ensayo fase II abierto de brazo único, analizó el uso de enzalutamida 160 mg/día (191). Incluyó 67 pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata sensible a la castración y donde el tratamiento hormonal estaba indicado. El objetivo primario fue la proporción de pacientes con una disminución de PSA del 80% o superior en la semana 25. Todos los análisis incluyeron a todos los pacientes que habían recibido al menos una dosis del fármaco. 62 pacientes de los 67 del estudio (92,5%, IC del 95% 86,2–98,8) obtuvieron esa disminución de PSA del 80% o superior en la semana 25. Los autores sugieren que enzalutamida en monoterapia en pacientes con cáncer de próstata hormonosensibles de distinta severidad proporciona un nivel de supresión de la enfermedad, y fue generalmente bien tolerada. Nueve pacientes (13%) desarrollaron un efecto adverso grado 3 o superior, en este estudio. Estos hallazgos proporcionaron una justificación para una mayor investigación de la respuesta clínica y los resultados con enzalutamida en hombres con cáncer de próstata sin niveles hormonales de castración. El seguimiento de este estudio a 3 años (192) demuestra que ningún paciente tuvo que interrumpir el tratamiento por progresión o toxicidad inaceptable, manteniendo la actividad antitumoral de enzalutamida en todos ellos.

### Estudios Fase III

ENZAMET (193) es un estudio fase III, randomizado, abierto, donde los pacientes con cáncer de próstata metastáticos hormonosensibles fueron randomizados a recibir tratamiento de supresión de testosterona junto con enzalutamida (brazo estudio) o con otro antiandrógeno no esteroideo estándar como bicalutamida, flutamida, etc (brazo control). Se randomizaron 1125 pacientes con una randomización 1:1 a cada brazo de estudio. La dosis de enzalutamida diaria fue de 160mg. La variable principal de estudio fue la supervivencia global. Supervivencia libre de progresión bioquímica y clínica y efectos adversos fueron variables secundarias del estudio.

Enzalutamida se asoció con una mayor estimación de supervivencia global (estimación de supervivencia global a 3 años con Kaplan-Meier fue de 80% en el grupo de enzalutamida frente a 72% en el grupo control). La reducción de riesgo de muerte fue de un 33% en el grupo de enzalutamida (HR 0,67; IC 95% 0,52-0,86; P= 0,002).

Enzalutamida también fue superior en supervivencia libre de progresión de PSA (174 progresiones de PSA en el grupo experimental frente a 333 progresiones del grupo control, HR 0,39; P<0.001) y en supervivencia libre de progresión clínica (167 y 320 eventos en los grupos de enzalutamida y control, respectivamente, HR 0,40; P<0.001) [figura 10]. La interrupción del tratamiento debida a acontecimientos adversos fue más frecuente en el brazo de estudio que en el de control (33 interrupciones frente a 14 del grupo control), presentando convulsiones el 1% de los pacientes tratados con enzalutamida (ningún paciente del grupo control).

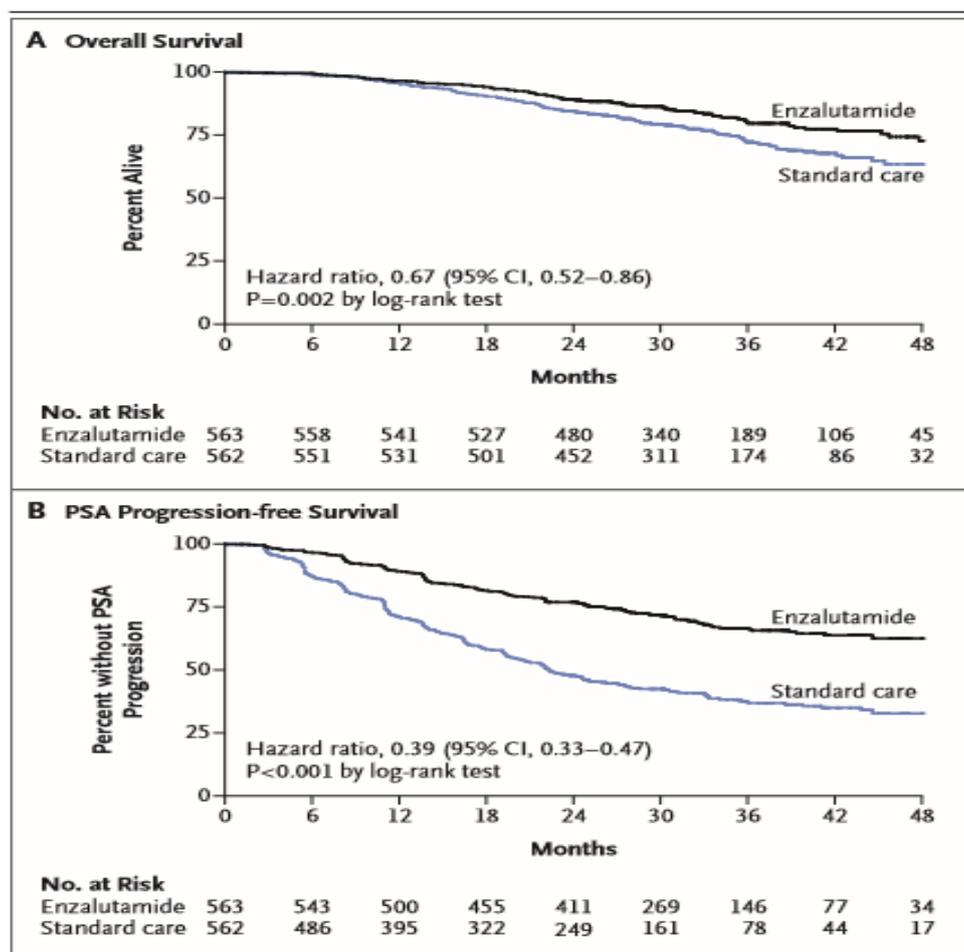


Figura 10. Gráficas de estimación supervivencia Kaplan-Meier de estudio ENZAMET. A: Supervivencia Global B: Supervivencia Libre de Progresión Bioquímica

ARCHES (194) es otro estudio fase III, multinacional, doble ciego, donde enzalutamida (160mg/día) más ADT se compara con placebo más ADT en pacientes con CPHS, estratificando por volumen y uso previo de docetaxel. Sus resultados se publicaron en 2019. 1150 pacientes fueron aleatorizados. El objetivo principal fue tiempo hasta progresión radiológica. El brazo de enzalutamida demostró menor riesgo de progresión radiológica y muerte de manera estadísticamente significativa (HR: 0.39; IC 95% 0.30 -

0.50;  $P < 0.001$ ) [figura 11]. Estos resultados fueron consistentes al analizar los distintos subgrupos especificados.

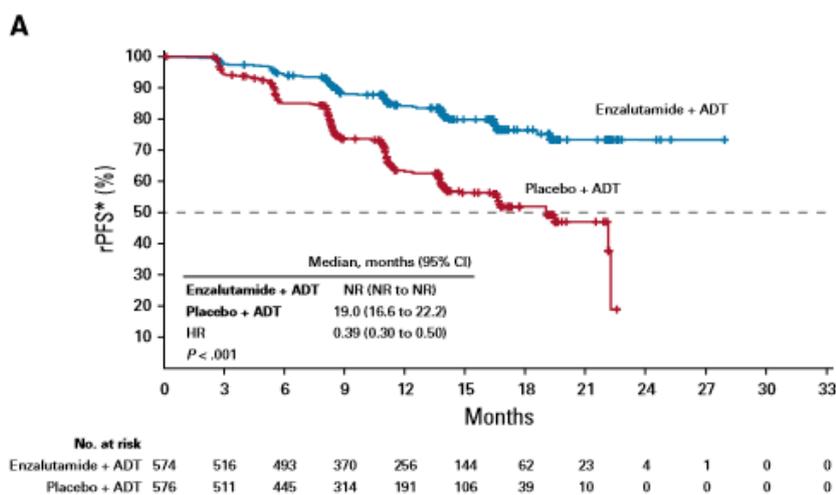


Figura 11. Gráfica de estimación Supervivencia Libre de Progresión Radiográfica Kaplan-Meier de estudio ARCHES

### 1.6.6 Combinación enzalutamida más radioterapia

El uso de deprivación androgénica se contempla en combinación con radioterapia para pacientes con cáncer de próstata no metastático, de riesgo intermedio, alto y localmente avanzado (108) y como tratamiento adyuvante tras prostatectomía en determinados pacientes (195). Su combinación ha demostrado beneficio en términos de supervivencia en cáncer de próstata de riesgo alto (196-197); sin embargo, su uso en cáncer de próstata de riesgo intermedio es más controvertido, ya que el empleo de terapia de deprivación androgénica completa no está exento de efectos adversos y su beneficio en supervivencia se demostró en estudios más antiguos que empleaban dosis de radioterapia inferiores a las actuales (198). Con el fraccionamiento convencional actual o hipofraccionamiento su combinación es más controvertida (196).

El empleo de nuevos antiandrógenos, como enzalutamida, en vez de terapia androgénica completa, se está testando para combinar con radioterapia y comprobar si la combinación es eficaz y con menos efectos adversos asociados que con el bloqueo androgénico completo. Como hemos visto anteriormente, en estudios como TERRAIN (187) y STRIVE (188) ya se demostró superioridad de enzalutamida frente a bicalutamida.

En la actualidad hay doce estudios registrados (199) estudiando la combinación de enzalutamida con radioterapia en cáncer de próstata. Cuatro están en fase de reclutamiento, seis activos que ya han finalizado reclutamiento, uno completado pendiente de publicación y otro suspendido por pandemia de COVID-19.

### Fase I-II

De los doce estudios que evalúan la combinación enzalutamida con radioterapia, once son fase I-II (uno fase I y diez fase II). Uno de ellos es un fase II español que inicia en 2017. Es el estudio ENZART. Se trata de un estudio fase II, intervencionista, multicéntrico, abierto, de brazo único, cuyo objetivo primario es evaluar la eficacia de la combinación de enzalutamida de manera neoadyuvante y adyuvante a la radioterapia en cáncer de próstata de riesgo intermedio, en términos de disminución de PSA sin causar los efectos asociados a la deprivación androgénica completa; ya que, como hemos visto previamente, enzalutamida en lugar de disminuir los niveles de testosterona, bloquea la acción de la testosterona en las células. El estudio acaba de finalizar el reclutamiento de pacientes (200).

### Fase III

ENZARAD es un estudio fase III, intervencionista, randomizado, abierto que compara enzalutamida con análogo de GnRH más radioterapia frente a tratamiento de deprivación androgénica completo convencional más radioterapia en pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo. El objetivo principal es la supervivencia global. El estudio comenzó a reclutar pacientes en 2015, sigue en activo, ya ha finalizado el reclutamiento y sus resultados están pendientes de publicar (201).

El estudio de la combinación de radioterapia con un antiandrógeno de segunda generación, como lo es enzalutamida, en líneas celulares de cáncer de próstata que sirva para testar la eficacia de esta combinación en investigación básica debería ser el aval indicado para los estudios clínicos en marcha que, como se acaba de especificar, están testando en clínica la eficacia en la combinación de estas dos terapias en pacientes con cáncer de próstata localizado.

El empleo en investigación clínica de los resultados de estos estudios sería ejemplo de investigación traslacional en cáncer de próstata y podría servir de base para

abrir horizontes terapéuticos futuros en el enfoque de esta patología tumoral en estadio localizado.

Se ha demostrado que, en este contexto de enfermedad, tanto la radioterapia externa por sí sola, como en combinación con braquiterapia y/o en combinación con el tratamiento hormonal completo de primera generación (según estadio clínico) aportan resultados excelentes en control local y supervivencia global. Quedaría por explorar, en base a los resultados de estos estudios en marcha, el lugar que le corresponde a la combinación que se propone y dejar la puerta abierta a nuevos estudios comparativos entre las distintas opciones terapéuticas disponibles en aras de encontrar la mejor herramienta terapéutica posible para estos pacientes en términos de supervivencia, toxicidad y calidad de vida.



## 2. OBJETIVOS

En este trabajo evaluamos el papel de enzalutamida como potenciador de la radioterapia en líneas celulares de cáncer de próstata, sirviendo como experimento de apoyo de investigación básica para investigación clínica. En este proyecto, proponemos estudiar este tratamiento combinado en dos líneas celulares humanas de cáncer de próstata representativas, LNCaP y PC3.

Los objetivos concretos son los siguientes:

- 1) Analizar el efecto del tratamiento con enzalutamida antes de la radioterapia sobre la proliferación de células tumorales prostáticas evaluando si existe un efecto sinérgico entre ambas
- 2) Comprobar el grado de apoptosis conseguido tras la combinación del tratamiento.
- 3) Abordar el potencial de la tecnología de monitorización en tiempo real (RTCA) para probar si el régimen terapéutico combinatorio de radioterapia con enzalutamida en las líneas celulares de cáncer de próstata puede justificar su aplicación de esta combinación en pacientes con cáncer de próstata localizado



### 3. HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo es que enzalutamida tiene un papel radiopotenciador en líneas celulares de cáncer de próstata y que este efecto sinérgico puede ser medido y demostrado por técnicas de medición de viabilidad en tiempo real y cuantificación de apoptosis.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Líneas celulares

Para el estudio del efecto sinérgico entre la radioterapia y la enzalutamida hemos utilizado dos líneas celulares establecidas a partir de biopsias procedentes de pacientes con cáncer de próstata avanzado. Una de las líneas celulares de cáncer de próstata elegida ha sido las células LNCaP, provenientes de un ganglio linfático metastático de un varón caucásico de 50 años diagnosticado de cáncer de próstata. Estas células expresan receptores de andrógenos y estrógenos, y por lo tanto son sensibles al bloqueo androgénico. La segunda línea utilizada, las células PC3, se obtuvieron a partir de una metástasis ósea de cáncer de próstata de un varón caucásico de 62 años. Esta segunda línea celular se ha utilizado en la tesis doctoral como línea control, dado que son insensibles a terapia androgénica.

Las células LNCaP se utilizan comúnmente en investigación en cáncer de próstata, siendo un buen modelo *in vitro* para el estudio de la biología celular y molecular del cáncer de próstata. Son células de adenocarcinoma de próstata humano sensibles a los andrógenos, derivadas de una metástasis de un ganglio linfático supraclavicular izquierdo de un varón caucásico de 50 años en 1977. Fenotípicamente, son células epiteliales adherentes que crecen fácilmente *in vitro* en agregados y como células individuales, con un tiempo de duplicación de 60 horas; forman clones sin problemas y son resistentes a los interferones de tipo I. Tienen un número de cromosomas modal de 76 a 91, indicativo de un cariotipo masculino humano con varios cromosomas marcadores. Los receptores de estrógenos y andrógenos específicos de alta afinidad están presentes en el citoplasma celular y también en el núcleo, donde ejercen sus funciones transactivadoras de genes. La línea LNCaP es hormonalmente sensible, como lo demuestra la modulación del

crecimiento celular *in vitro* de la 5 alfa-dihidrotestosterona y la producción de fosfatasa ácida. Las células LNCaP también expresan PSA.

Las células PC3 son una línea celular procedente de una muestra de cáncer de próstata humano utilizadas ampliamente en investigación y desarrollo de fármacos. Son útiles para investigar cambios bioquímicos en células de cáncer de próstata avanzado y para evaluar su respuesta a los agentes terapéuticos. La línea celular PC3 se estableció en 1979 a partir de metástasis óseas de cáncer de próstata en un varón caucásico de 62 años. Estas células no responden a los andrógenos, glucocorticoides o factores de crecimiento de fibroblastos, pero los resultados sugieren que las células responden a factores de crecimiento epidérmico. Las células PC3 tienen un alto potencial metastático en comparación con las células LNCaP, que tienen un bajo potencial metastático en modelos preclínicos de xenotransplantes en ratones y en estudios de migración celular. Las comparaciones de la expresión proteica de PC3, LNCaP y otras células han demostrado que comparten características propias del carcinoma neuroendocrino de células pequeñas.

Las células PC3 expresan bajos niveles de 5-alfa reductasa y baja actividad de fosfatasa ácida y son PSA-negativas. Además, el análisis cariotípico ha demostrado que PC3 son casi triploides, con 62 cromosomas. El análisis de la banda Q demostró la pérdida del cromosoma Y. Desde el punto de vista morfológico, la microscopía electrónica reveló que las células PC3 muestran características de un adenocarcinoma mal diferenciado. Tienen características comunes a las células neoplásicas de origen epitelial, como numerosas microvellosidades, complejos de unión, núcleos y nucleolos anormales, mitocondrias anormales, laminillas anulares y cuerpos lipoidales.

Las líneas celulares de cáncer de próstata humanas LNCaP y PC3 se adquirieron a partir de la colección de células y tejidos ATCC, uno de los bancos de líneas celulares más importantes, y fueron puestas en crecimiento en cultivos celulares en las condiciones recomendadas por la ATCC. Las células LNCaP crecieron en medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640); mientras que las células PC-3 lo hicieron en el medio Ham F-12 (F-12). Ambos medios de cultivo se complementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), penicilina (100 unidades/mililitro) y estreptomina (100 microgramos/mililitro). Los cultivos celulares se incubaron a 37 grados centígrados (°C) en una incubadora de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al 5%. Siguiendo las indicaciones de la ATCC, las células se cultivaron realizando los siguientes pasos:

## Cultivo celular

1. Descongelamos los viales que contenían las células en un baño de agua de 37°C. Transferimos las células a 10 mililitros (ml) de su medio correspondiente (RPMI 1640, en el caso de LNCaP y F-12, en el caso de PC3) en un tubo cónico de 15 ml.
2. Centrifugamos a 700 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Recuperamos el sedimento celular (pellet) en 10 ml del medio indicado previamente para cada línea celular y lo transferimos a un plato de 10 centímetros (cm).
4. Dejamos crecer las células hasta aproximadamente 70-80% de confluencia (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células).
5. Lavamos con tampón fosfato salino o buffer fosfato salino tibio (PBS, por sus siglas en inglés) previo a la tripsinización (tratamiento con tripsina, enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis, para la disociación celular)
6. Recogimos las células en 10 ml del medio correspondiente y las distribuimos en placas de cultivo a una alta densidad, aproximadamente un millón de células por placa de cultivos celulares de 10 cm de diámetros, en un volumen final de 10 ml de medio completo. Una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, los cultivos se volvieron a tripsinizar, las células se contaron y se volvieron a colocar en celdillas E8 ACEA para el estudio de su crecimiento en tiempo real.

### 4.2 Enzalutamida

Se mantuvo la preparación de enzalutamida en el agente criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 milimoles (mM). Posteriormente la diluimos en los medios de cultivo correspondientes a cada línea celular, a concentraciones de trabajo correspondientes, antes de su adición a los cultivos celulares.

La concentración final de DMSO en los medios de cultivo se redujo a un rango de 0,01 a 0,1%, concentraciones que no inducían muerte celular por apoptosis. Las líneas celulares LNCaP y PC-3 se trataron con enzalutamida o DMSO (control) durante tres días a sus concentraciones inhibitorias medias máximas (IC50, por sus siglas en inglés), concentración que indica cuánta cantidad de un fármaco se necesita para inhibir un proceso biológico concreto a la mitad.

Tras esto, las células se irradiaron y su crecimiento y viabilidad se monitorizaron en tiempo real, como veremos en el apartado correspondiente.

### 4.3 Radioterapia

Se utilizaron 3 dosis de radioterapia diferentes de 10, 20 y 30 Gray (Gy) atendiendo a los resultados de experimentos de prueba previos con 2, 5 y 8 Gy. Cada una de estas dosis se administró en fracción única para cada línea celular y por triplicado, una por cada experimento. Utilizamos para la irradiación fotones de 6 megavoltios (MV) administrados por un acelerador lineal Clinac 21ex de la casa comercial Varian en el Servicio de Oncología Radioterápica del Complejo Hospitalario de Navarra en colaboración con el Servicio de Radiofísica del mismo centro. La tasa de dosis empleada fue de 600 Unidades de Monitor (UM) por minuto, utilizando un campo de 16x12 cm con una distancia fuente superficie de 100 cm.

### 4.4 Citometría de Flujo

Las células se recogieron y se tiñeron usando el marcador de apoptosis eBioscience Anexina V según lo descrito por el fabricante, y que se detalla a continuación. Las anexinas son una familia de proteínas que se unen a fosfolípidos de manera calcio-dependiente y se unen a la fosfatidilserina (PS) para identificar células apoptóticas, en las que PS se transloca a la superficie de las células apoptóticas. En las células sanas, la PS se encuentra principalmente en la parte citosólica de la membrana plasmática. Al inicio de la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica en la bicapa lipídica y se transloca a membrana extracelular, que se puede detectar con Anexina V marcada con fluorescencia. Las muestras se analizaron en el citómetro FACS CANTO (BD bioscience) y los datos con el programa Flowjo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### Procedimiento tinción Anexina V

1. Diluimos la solución tampón (buffer) de unión de anexina a la concentración de trabajo utilizando agua destilada (dH<sub>2</sub>O) (1 ml 10X solución reguladora de unión más 9 ml dH<sub>2</sub>O).
2. Lavamos las células una vez en PBS, después una vez en 1X solución reguladora de unión.
3. Suspendimos las células en solución tampón de unión a 1-5x10<sup>6</sup>/ml.

4. Añadimos 5 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de Anexina V conjugada con el fluorocromo alofococianina (APC) a 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular.
5. Incubamos durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavamos las células en 1X solución reguladora de unión y resuspendimos en 200  $\mu\text{l}$  de dicha solución reguladora
7. Agregamos 5  $\mu\text{l}$  de solución de tinción de yoduro de Propidium
8. Analizamos por citometría de flujo pasadas 4 horas de la tinción, almacenamos las células a 2-8 °C en la oscuridad

#### 4.5 Monitorización celular en tiempo real (RTCA por sus siglas en inglés).

El crecimiento celular y su viabilidad se monitorizaron utilizando la tecnología de XCelligence RTCA, de la compañía biotecnológica ACEA Bioscience, Inc, San Diego, California. Esta tecnología tiene una alta sensibilidad para detectar cambios en el tamaño, la forma y el crecimiento de las células, por lo que es una técnica muy útil para el seguimiento de los efectos de agentes farmacológicos en la biología celular. Además, RTCA integra los datos en tiempo real para trazar curvas de inhibición con las que calcular con precisión las dosis inhibitorias (ID) en un momento determinado. Las curvas de crecimiento tras dos semanas de cultivo se obtuvieron utilizando el software ACEA con los datos obtenidos con RTCA. Primero se probó el uso de monitorización celular en tiempo real para estimar la sensibilidad de las dos líneas celulares a enzalutamida, ya que la mayoría de los estudios utilizan ensayos basados en punto final (basados en enzimas que mide la cantidad de material por la cantidad de sustrato consumido o producto formado en el transcurso de una reacción). Como se ha comentado anteriormente, se utilizaron concentraciones de enzalutamida que variaron entre 0 a 10 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) a los cultivos celulares y se controló su crecimiento hasta 12 días. Se añadió DMSO como control negativo a la concentración equivalente a la presente en los tratamientos con enzalutamida. Los tratamientos se realizaron simultáneamente por duplicado y los experimentos se repitieron tres veces independientemente. Tras la irradiación de las dos líneas celulares repetimos de nuevo la monitorización en tiempo real.

## 4.6 Estadística

Las líneas celulares LNCaP y PC3 se descongelaron y cultivaron en dos ocasiones y cada experimento se repitió por triplicado. Los datos celulares correspondientes al crecimiento celular medido por RTCA fueron altamente reproducibles y siguieron una distribución normal tal y como se comprobó previamente mediante tests de normalidad. Por lo tanto, los grupos de tratamiento se compararon con el test paramétrico ANOVA unidireccional utilizando las medias de todos los experimentos replicados por triplicado, durante las últimas 24 horas de cultivo. Las comparaciones por pares se realizaron *a posteriori* con el test estadístico de Tukey. Los datos de tinción con Anexina V se compararon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, ya que las varianzas de los grupos eran significativamente diferentes. Para llevar a cabo todos los test estadísticos utilizamos el paquete de análisis científico GraphPad Prism.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estimación de la IC50 de enzalutamida en dos líneas celulares de cáncer de próstata humano metastático mediante la monitorización celular en tiempo real

En primer lugar, analizamos la sensibilidad a enzalutamida de las dos líneas celulares de cáncer de próstata humano mediante la monitorización en tiempo real del crecimiento celular (xCelligence RTCA). Analizamos la línea celular LNCaP, sensible al bloqueo androgénico, como hemos explicado en apartado de Materiales y Métodos, y las células PC-3, elegidas como células de control ya que son insensibles a los andrógenos.

El crecimiento de las células LNCaP presentaba una cinética exponencial que se retrasaba de manera muy significativa con el aumento de las concentraciones de enzalutamida, especialmente a partir de 5  $\mu\text{M}$  [figura 12]. Por el contrario, no se observaron efectos significativos en el crecimiento de las células PC-3 en ninguna de las concentraciones de enzalutamida testadas, de acuerdo con su resistencia intrínseca a la enzalutamida [figura 13].

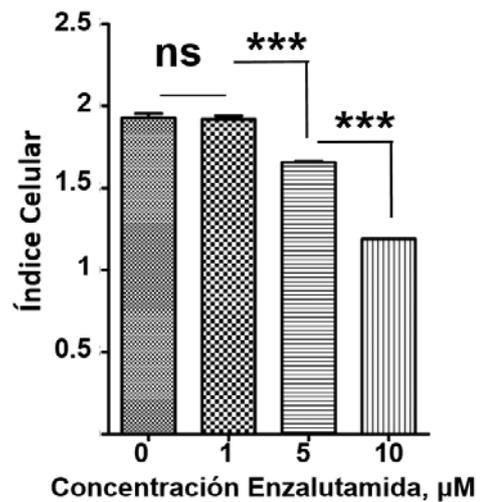
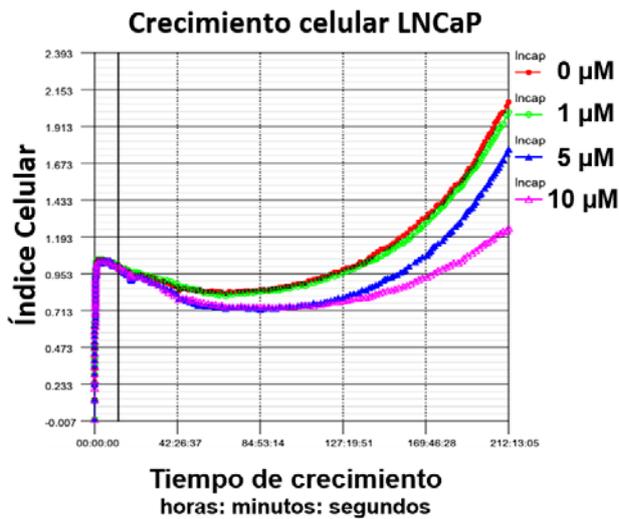


Figura 12. Crecimiento celular de las células LNCaP evaluado por monitorización celular en tiempo real (RTCA). (a) El gráfico de la izquierda muestra la cinética del crecimiento en tiempo real de las células LNCaP tratadas con DMSO (control negativo de enzalutamida; en color rojo) o tratadas con enzalutamida a la concentración de 1,5 o 10  $\mu\text{M}$  (colores verde, azul y rosa, respectivamente), como se indica en el gráfico. A la derecha, los datos por duplicado de los experimentos RTCA representados mediante diagrama de barras

ns: No diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

\*\*\*: Diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.001$ )

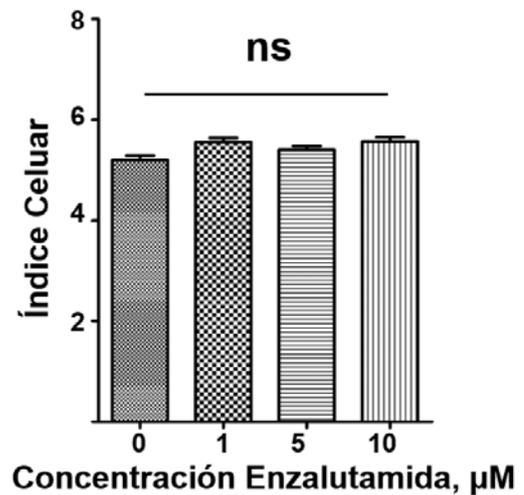
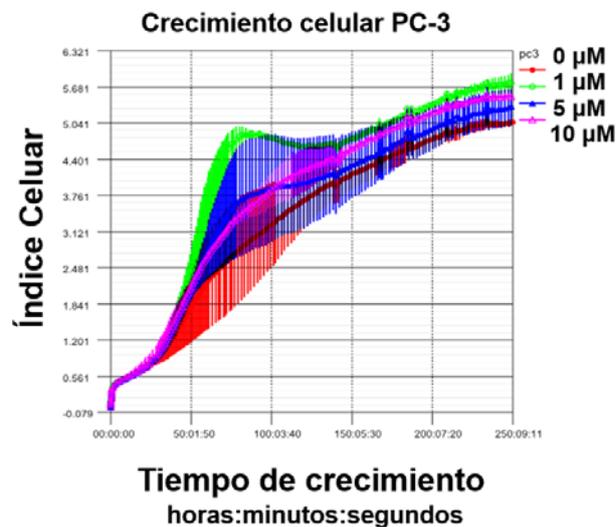


Figura 13. Crecimiento celular de las células PC3 evaluado por monitorización celular en tiempo real (RTCA). (a) El gráfico de la izquierda muestra la cinética del crecimiento en tiempo real de las células PC3 tratadas con DMSO (control negativo de enzalutamida; línea roja) o tratadas con enzalutamida a la concentración de 1, 5 o 10  $\mu\text{M}$  (líneas verdes, azul y rosa, respectivamente), como se indica en el gráfico. A la derecha, los datos por duplicado de los experimentos RTCA representados mediante diagrama de barras.

ns: No diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

A continuación, calculamos las concentraciones IC50 con los datos de la monitorización en tiempo real (RTCA) para las dos líneas celulares [figura 14]. La IC50 calculada para las células LNCaP fue de  $5,6 \mu\text{M} \pm 0,8 \mu\text{M}$ . Este valor de IC50 obtenido fue comparable a la publicada en otros trabajos utilizando ensayos de citotoxicidad de punto final (entre 1 y  $5 \mu\text{M}$ ). Por el contrario, el valor IC50 calculado para las células PC-3 tuvo que ser extrapolado hasta un valor no fisiológico ( $34,9 \mu\text{M} \pm 9 \mu\text{M}$ ), dada su altísima resistencia a enzalutamida al menos en el rango de concentraciones utilizadas. Estos resultados son los esperados y confirman la resistencia intrínseca de las células PC-3 al bloqueo androgénico.

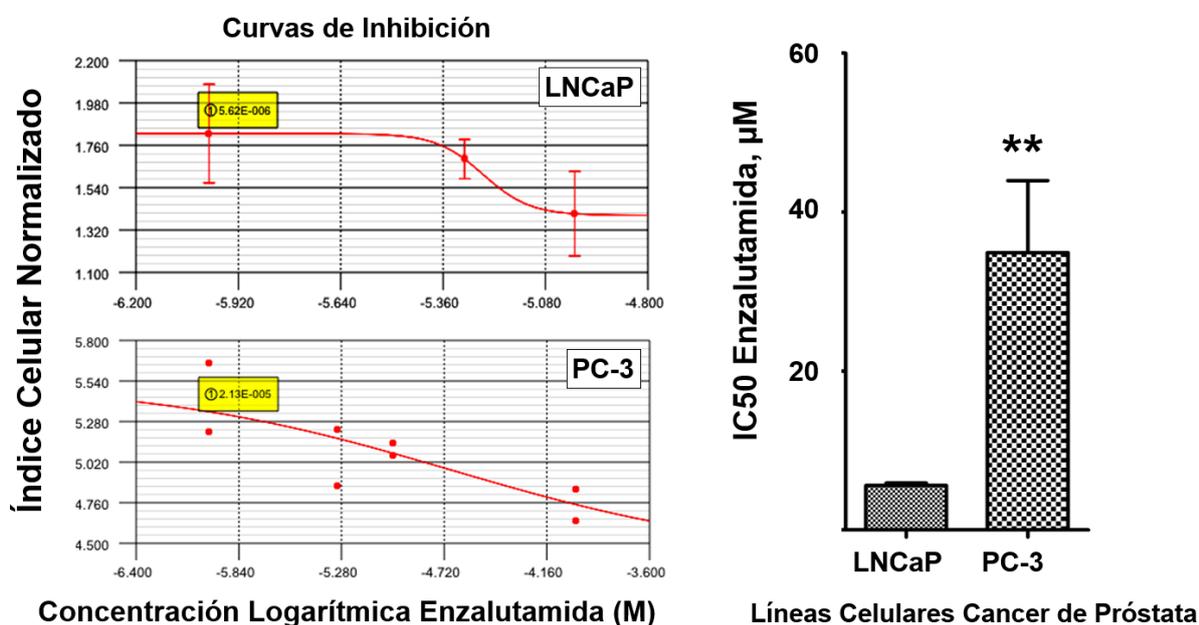


Figura 14. Los gráficos de la izquierda muestran las gráficas de inhibición de células LNCaP (gráfico superior) y de células PC-3 (gráfico inferior) tras ser tratadas con enzalutamida a concentraciones crecientes, según lo calculado por RTCA. Los valores IC50 calculados se resaltan en amarillo dentro de cada gráfico. La figura de la derecha de diagrama de barras representa los IC50 de enzalutamida calculados para las células LNCaP y PC-3, resultantes de tres experimentos independientes, cada experimento por duplicado. Se muestran las comparaciones estadísticas pertinentes.

\*\* : diferencias estadísticamente muy significativas,  $p < 0.01$ .

La monitorización de células en tiempo real se basa en las lecturas de impedancia de los circuitos eléctricos presentes en el fondo de las placas de cultivo celular en las que las células se adhieren y proliferan. Aunque puede utilizarse para comprobar la viabilidad de las células, esta técnica no proporciona directamente información sobre la muerte celular. Por lo tanto, confirmamos la inducción de apoptosis producida por enzalutamida en las células de cáncer de próstata mediante un ensayo de apoptosis por citometría de

flujo estándar basado en la tinción con Anexina V marcada con un agente fluorescente alofococianina en presencia de una tinción con yoduro de propidio para identificar células que conservan su integridad estructural. Para comprobar esto, las dos líneas celulares se trataron con una concentración no citotóxica de 0,1% de DMSO o de enzalutamida durante 48 horas a sus correspondientes concentraciones de IC50 [figura 14]. A continuación, se cuantificó mediante citometría de flujo el porcentaje de células Anexina V positivas resultante y se confirmó que la enzalutamida aumentaba significativamente la apoptosis en las células LNCaP tratadas. Como era de esperar, y de acuerdo con evidencias experimentales previas de otros autores, las células PC3 eran refractarias a la inducción de la apoptosis por enzalutamida [figura 15].

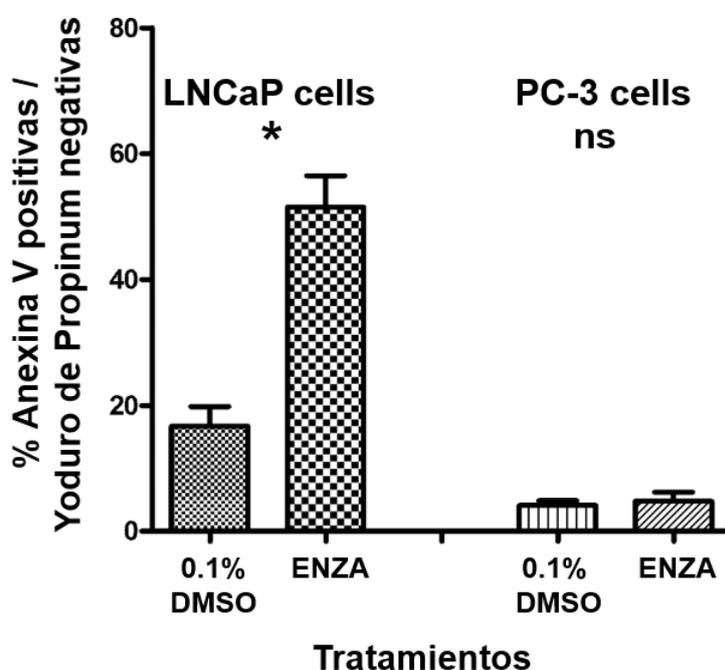


Figura 15. Gráfico de barras que representa el porcentaje de células Anexina V positivas / yoduro de propidio negativas en cultivos de las líneas celulares indicadas, tratadas con DMSO o con enzalutamida a las concentraciones de IC50 calculadas en figura anterior [Figura 14].

\* diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

ns: no diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

## 5.2 El pretratamiento con enzalutamida potencia la radioterapia.

Comprobamos en experimentos preliminares para establecer las dosis que al tratar con radioterapia a dosis de 2, 5 y 8 Gy los cultivos celulares de LNCaP y PC3 no mostraban ninguna alteración en el crecimiento y continuaban su cinética sin detenerse.

Las líneas celulares de cáncer de próstata eran muy resistentes a la radioterapia en comparación con otras líneas celulares de cáncer distintas a cáncer de próstata. Por lo tanto, probamos si la enzalutamida podía sensibilizar a las células frente a la muerte inducida por la radioterapia. Para averiguarlo, las células LNCaP y PC-3 fueron pretratadas con DMSO o enzalutamida en sus concentraciones IC50 durante 3 días, confirmando durante este tiempo que las células presentaban integridad y viabilidad. A estas concentraciones, el crecimiento celular se retrasa, pero las células siguen siendo en su mayoría viables. Tras esto, las células fueron irradiadas con 10, 20 y 30 Gy y su crecimiento y viabilidad fueron monitorizados por RTCA. Como se esperaba de nuestros estudios preliminares, se necesitaron dosis de 30 Gy para inducir la muerte celular mensurable por RTCA en las células LNCaP no tratadas con enzalutamida. En cambio, el pretratamiento de las células LNCaP con enzalutamida sensibilizó fuertemente a las células LNCaP frente a la radioterapia, provocando una rápida muerte celular a la dosis mínima probada de 10 Gy, reflejando un potente efecto sinérgico entre enzalutamida y radioterapia [figura 16]. Las células PC-3, que ya habían mostrado previamente su resistencia a enzalutamida [figura 13], demostraron, de igual manera, su resistencia a la radioterapia, mostrando una cinética de crecimiento exponencial con las tres dosis de irradiación probadas. El pretratamiento en esta línea PC3 con 40  $\mu$ M de enzalutamida no tuvo ningún efecto sobre su crecimiento [figura 17].

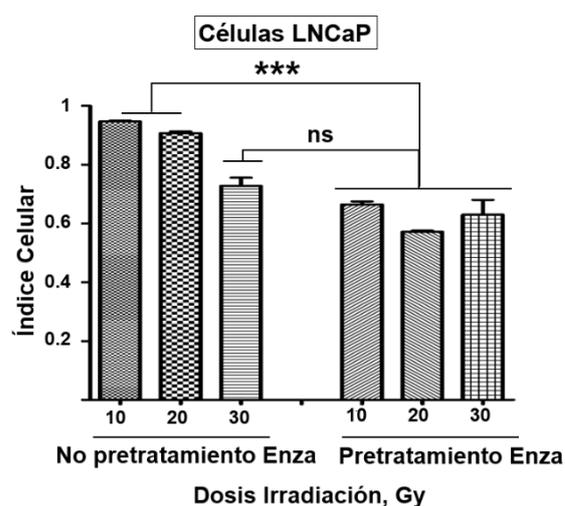


Figura 16. Datos de crecimiento celular por RTCA de células LNCaP tratadas con DMSO (control negativo, gráfico de la izquierda) o tratadas con enzalutamida (gráfico de la derecha) durante tres días tras haber recibido radioterapia a las dosis de irradiación de 10,20 y 30 Gy como se indica en el gráfico.

ns: no diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ )

\*\*\*: diferencias estadísticas altamente significativas ( $p<0.001$ )

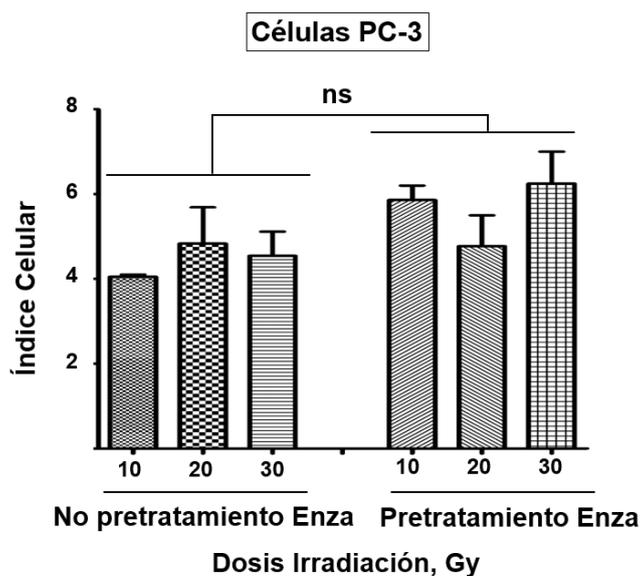


Figura 17. Datos de crecimiento celular por RTCA de células PC-3 tratadas con DMSO (control negativo, gráfico de la izquierda) o tratadas con enzalutamida (gráfico de la derecha) durante tres días tras haber recibido radioterapia a las dosis de irradiación de 10,20 y 30 Gy como se indica en el gráfico.

ns: No diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ )

Estos resultados demostraron que un tratamiento previo con enzalutamida radiosensibiliza las líneas celulares de cáncer de próstata, siempre y cuando las células respondan previamente al bloqueo androgénico. Para evaluar si estos efectos sinérgicos se debían a un aumento de la apoptosis, se utilizó la tinción de la Anexina V y su análisis con citometría de flujo. Como se observó con la monitorización con RTCA, las células LNCaP pretratadas con DMSO eran muy resistentes a la apoptosis inducida por la radioterapia a una dosis de 10 Gy. En cambio, el pretratamiento con concentraciones IC50 de enzalutamida sensibilizó enormemente a las células y aumentó considerablemente la apoptosis inducida por radioterapia a una dosis de 10 Gy [figura 18]. Las células PC-3 permanecieron insensibles a enzalutamida, a radioterapia o a su combinación, lo que sugiere que las propiedades apoptóticas de la enzalutamida eran necesarias para la radiopotenciación.

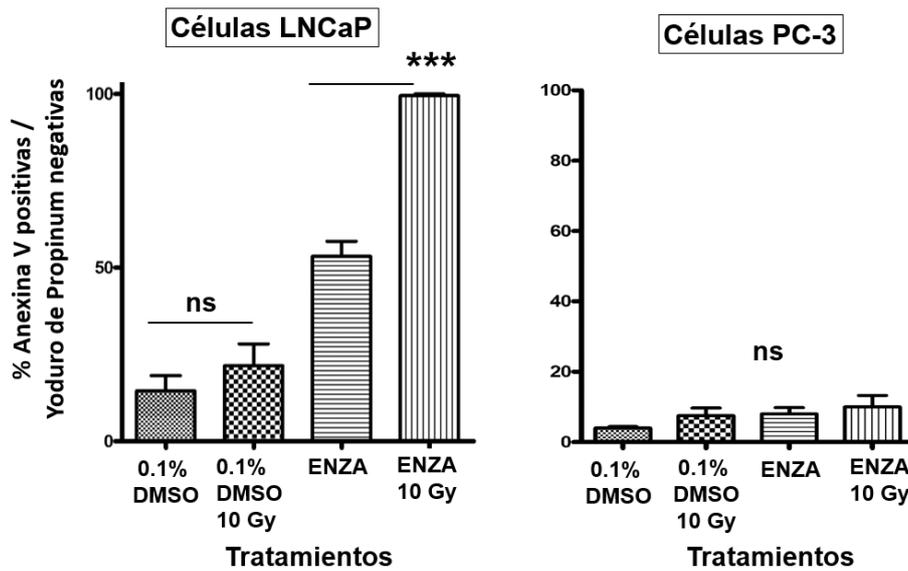


Figura 18. Diagrama de barras que representa el porcentaje de células Anexina V positivas / yoduro de propidio negativas en cultivos de las líneas celulares indicadas, tratadas con DMSO o enzalutamida a las concentraciones de sus valores de IC50 seguido de tratamientos con radioterapia con dosis de 10 Gy

ns: no diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

\*\*\*: diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.001$ )



## 6. DISCUSIÓN

La radioterapia supone uno de los pilares fundamentales del tratamiento de cáncer de próstata localizado en primera línea. Puede realizarse en combinación con braquiterapia y, en muchos casos, junto con tratamiento hormonal de forma, como mínimo, concomitante y adyuvante a la radioterapia (108); ya que la terapia contra el cáncer de próstata depende en gran medida de la deprivación de andrógenos.

La combinación de radioterapia con terapias hormonales ha demostrado mejores resultados de supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata localizado (202-204). Sin embargo, la mayoría de los pacientes se vuelven resistentes a la ADT con antiandrógeno de primera generación y análogo de GnRH debido al bloqueo incompleto de la señalización del ligando-AR, a amplificaciones del AR, a mutaciones del AR, a actividades aberrantes del corregulador del AR o a la expresión de variantes del AR (por ejemplo ARV7) (205,206) cuya consecuencia implica recurrencia de la enfermedad y progresión hacia un estadio más avanzado de la enfermedad como es el cáncer de próstata resistente a la castración.

La enzalutamida es un antiandrógeno de segunda generación, y consiste en un inhibidor competitivo del receptor de andrógeno, que impide la unión del ligando al receptor androgénico y bloquea su translocación nuclear. La enzalutamida se ha utilizado como tratamiento exclusivo y ha mostrado de manera contundente su eficacia en primera y segunda línea en cáncer de próstata avanzado (148, 149, 151, 193).

Parece lógico, por tanto, el estudio de la combinación de dos tratamientos altamente eficaces en distintos estadios de cáncer de próstata, como lo son enzalutamida y radioterapia, y valorar si la suma de sus mecanismos de acción supone una ventaja clínica respecto a la obtenida de manera individual.

Dos artículos publicados recientemente analizaron de forma paralela a nuestros experimentos, el potencial de esta combinación (207-208). Estos estudios independientes

obtuvieron las mismas conclusiones que las expuestas en la presente tesis doctoral. Brevemente, que los tratamientos con enzalutamida tiene un papel radiosensibilizante en líneas celulares de cáncer de próstata. El mecanismo de esta radiosensibilidad puede implicar procesos críticos para el crecimiento tumoral. Enzalutamida inhibe la actividad de proteínas involucradas en la respuesta al daño y reparación del ADN, como la subunidad catalítica de proteínas quinasas dependiente de ADN (DNAPKcs) y, a través de esta inhibición de la reparación del ADN, mejora la apoptosis inducida por la radiación y la senescencia.

El intervalo de tiempo y la cronología entre el tratamiento de enzalutamida y radioterapia también puede jugar un papel importante en la efectividad de la combinación. En esta tesis se han tratado las líneas celulares con enzalutamida a su concentración IC50 y, 72 horas más tarde, se sometieron las líneas celulares a tratamientos con radioterapia. Ghashghaei et al (207) experimentaron con distintos intervalos de tiempo y encuentran que la administración de enzalutamida 2 horas antes de la administración de la radioterapia es el orden cronológico de mayor potencia radiosensibilizante de los tres esquemas estudiados; ya que no encontraron el mismo efecto radiosensibilizante ni administrando enzalutamida 24 horas antes ni 24 horas después de la radioterapia. Además, el mecanismo molecular por el que la enzalutamida estimula la apoptosis producida por la radioterapia en las células tumorales de cáncer de próstata también parece diferir según su momento de aplicación. Los autores de este estudio encontraron que al administrar enzalutamida 2 horas antes que la radioterapia se inhiben las DNAPKcs impidiendo la reparación de la rotura de doble cadena de ADN producido por la radioterapia. Sin embargo, al administrar enzalutamida 24 horas antes de la radioterapia no encontraron la inhibición de DNAPKcs, explicando el efecto radiosensibilizante de enzalutamida por la alteración en la regulación del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés).

Triggiani et al (208) demostraron un aumento de fosforilación de histonas H2AX en las células LNCaP pretratadas con enzalutamida frente a la misma línea celular pretratada con control (DMSO). Esta diferencia no se observa en la línea PC3 entre las células pretratadas con enzalutamida o DMSO. La fosforilación de las histonas H2AX es un mecanismo implicado en la reparación de la rotura de doble cadena de ADN (209), daño demostrado que se produce en el ADN tras la irradiación (210). El aumento de esta fosforilación en las células sensibles a andrógenos pretratadas con enzalutamida demuestra el papel radiosensibilizante de enzalutamida en estas líneas celulares. En la

presente tesis comprobamos que al pretratar con enzalutamida 72 horas antes de la radioterapia se observó un aumento de apoptosis en las células sensibles a tratamiento hormonal, y que este mecanismo contribuye a su radiosensibilización. El aumento de la apoptosis se vio reflejado en un aumento de positividad para Anexina V, marcador de apoptosis, en estas células, superior a la cifra de positividad encontrada en las células control no pre-tratadas antes de la radioterapia. Otros autores han intentado repetir estos hallazgos, pero con combinaciones bicalutamida/ radioterapia. Quero et al (211) utilizó el mismo método de detección de apoptosis basado en medición de porcentaje de células Anexina V positivas. No encontró diferencias significativas entre las células pretratadas o no con bicalutamida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de Bromfield et al (212) donde tampoco se encontraron diferencias en cuantificación de apoptosis en células pretratadas con bicalutamida antes de aplicación de radioterapia. Quedaría por dilucidar en investigaciones futuras, qué mecanismos moleculares adicionales podrían contribuir a esta sinergia enzalutamida/radioterapia, y si son más potentes que el conseguido por la vía de las DNAPKcs cuando se administra enzalutamida 2 horas antes de la radioterapia y no 72 horas antes.

Si enzalutamida radiosensibiliza más a las células en combinación con radioterapia que bicalutamida, antiandrógeno utilizado actualmente en clínica, es otra de las cuestiones que habrá que analizar. En este sentido Ghashghaei y su equipo (207) pretrataron las líneas celulares de cáncer de próstata con bicalutamida y no encontraron un efecto tan radiosensibilizante como el encontrado con enzalutamida.

Estos resultados sugieren que un bloqueo más eficaz y profundo de la actividad y señalización del AR con enzalutamida potencia significativamente el efecto del tratamiento de radiación en comparación con la ADT en células de cáncer de próstata sensibles a hormonas.

Estudios anteriores han demostrado que la ADT con bicalutamida potencia modestamente la respuesta a la radiación en las células de cáncer de próstata que expresan receptor androgénico y son, por tanto, sensibles a andrógenos, y no tiene ningún efecto en las células de cáncer de próstata resistentes a andrógenos que no expresan AR (213). Quero *et al.* (211) evaluaron el uso de bicalutamida como radiosensibilizante y encontraron que, en realidad, bicalutamida provocaba una interacción antagónica y menos pronunciada tras la administración de radiación en células LNCaP. Específicamente, los investigadores observaron que el tratamiento con bicalutamida 48h antes de la radiación tenía el menor efecto radiomodulador en cáncer de próstata localizado. En 2006, el grupo

de See (Early Prostate Cancer Trialists' Group) demostró para pacientes con cáncer de próstata localmente avanzado (T3-T4) que la utilización de bicalutamida de manera adyuvante a la radioterapia aumentaba de forma significativa la supervivencia global y supervivencia libre de progresión bioquímica en un 44% frente al empleo de radioterapia de manera exclusiva (214).

La duración del bloqueo androgénico es otra de las cuestiones que habría que resolver. Hasta la fecha, en base a los datos de los que disponemos en la combinación de bloqueo hormonal completo con antiandrógeno y análogo GnRH y radioterapia, la secuencia y duración del bloqueo viene determinada por las características clínicas y anatomopatológicas de cada paciente, variando la duración de la terapia hormonal según grupos de riesgo (108).

Para pacientes considerados de riesgo intermedio hasta la fecha, se han realizado al menos ocho ensayos aleatorizados [dos canadienses, uno irlandés, uno australiano, dos estadounidenses (del Grupo de Oncología Radioterápica, RTOG por sus siglas en inglés, RTOG-9202, 9910) y dos realizados por la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer, EORTC por sus siglas en inglés] donde se evalúa, en términos de supervivencia, la duración óptima de ADT y hay otros tres ensayos aleatorizados adicionales (dos canadienses y uno de la EORTC) cuyo objetivo principal evaluado es el de control de PSA (215). El análisis de estos estudios junto con el metaanálisis de Roach (216) sugieren que, para los pacientes con cáncer de próstata localizado de riesgo intermedio, no hay razón para extender la ADT más allá de 4 meses cuando se combinan con radioterapia externa, realizando el tratamiento de manera neoadyuvante y adyuvante a la radioterapia. El estudio fase III canadiense liderado por J. Crook (217) asignó al azar a 378 pacientes a 3 u 8 meses de ADT más radioterapia, no encontrando ganancia en términos de supervivencia global al aumentar a 8 meses el tratamiento hormonal, salvo en el subgrupo de pacientes de alto riesgo del estudio. Otros esquemas de duración de ADT junto a radioterapia empleados y comparados en estos estudios fueron 4 frente a 8 meses (218) del grupo irlandés; 0 *versus* (vs) 3 meses o 6 meses del grupo australiano (219); o 4 frente a 9 meses del estudio fase III RTOG-9910 (220).

Para pacientes considerados de alto riesgo la combinación de radioterapia con ADT de larga duración (neoadyuvante, concomitante y adyuvante a la radioterapia) parece ser, en términos de supervivencia, superior al empleo de ADT con una duración más reducida (216). Esta afirmación ha sido posteriormente confirmada por estudios fase

III como el EORTC-22961 (221) que comparó 6 meses de ADT vs 36 meses en 1113 pacientes con cáncer de próstata localmente avanzado y demostró la superioridad de este último. Otro estudio fase III, RTOG-9202 (222), también demostró que la adición de 24 meses de ADT adyuvante vs 4 meses de ADT podría mejorar la supervivencia en pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo. Estos dos ensayos demuestran la superioridad de, al menos 24 meses de ADT para estos pacientes en su objetivo primario (supervivencia global), pero, también en supervivencia cáncer específica, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de control bioquímico. En el análisis de subgrupos, los pacientes con una puntuación de Gleason de 8 a 10 fueron el subgrupo de pacientes que obtuvieron una mayor mejora significativa en la supervivencia global con ADT de larga duración junto con radioterapia.

Los ensayos clínicos en marcha con enzalutamida y radioterapia están evaluando la combinación de forma neoadyuvante y concomitante (6 meses) para pacientes con cáncer de próstata de riesgo intermedio (200) y aumentando el tiempo de bloqueo hormonal hasta 24 meses de en pacientes clasificados en riesgo alto (201). Habrá que esperar resultados definitivos para valorar eficacia y comparar, en un futuro, si debido a la radiosensibilidad en líneas celulares sensibles a andrógenos demostrada en nuestro estudio de tesis (223) y los otros dos estudios similares (207-208), la terapia de deprivación androgénica con enzalutamida puede acortarse en este subgrupo de pacientes que reciben además radioterapia.

En este estudio, hemos aplicado la monitorización celular en tiempo real basada en la impedancia para evaluar el potencial de la combinación de enzalutamida y radioterapia en dos líneas celulares de cáncer de próstata humano (células LNCaP, sensibles a Enzalutamida y células PC-3, resistentes a Enzalutamida). Estas dos líneas celulares se usan ampliamente en la evaluación preclínica de los tratamientos para el cáncer de próstata (224, 225).

A pesar de que la mayoría de los estudios sobre agentes apoptóticos utilizan ensayos de citotoxicidad de punto final [como 3-(4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) o métodos de recuento nuclear, entre otros] o ensayos clonogénicos (226,227), se han desarrollado tecnologías basadas en impedancia para monitorizar el crecimiento y viabilidad celular en tiempo real, como la tecnología xCelligence RTCA (228), utilizada en la presente tesis doctoral. La tecnología xCelligence mide los cambios de impedancia en una malla de microelectrodos de oro interdigitados ubicados en el fondo (placa electrónica) o en la parte inferior de una

membrana con microporos (placa CIM16). Estos cambios de impedancia son causados por el aumento a la resistencia del paso de la corriente eléctrica durante la modificación gradual de la ocupación de la superficie de los electrodos por las células durante el transcurso del tiempo, ya sea causado por proliferación, migración o invasión. Por lo tanto, su medición proporciona un índice relativo de viabilidad, migración e invasión celular. Éste método de cuantificación es directamente proporcional a la morfología, propagación, adherencia y recuento celular (229,230). Nuestro estudio de tesis, hasta la fecha, es el único que ha utilizado esta tecnología en el análisis de la combinación de enzalutamida y radioterapia en líneas celulares de cáncer de próstata. La decisión de utilizar este método de medida de viabilidad celular y no los ensayos de punto final considerados técnica de referencia, fue debida a que XCelligence RTCA permite un seguimiento a tiempo real con alta sensibilidad. Estas características convierten a la técnica en una herramienta muy útil para el seguimiento de los efectos de agentes farmacológicos en cultivos celulares (231); siendo, además, y en contraste con los ensayos de punto final clásicos, un método de detección menos laborioso.

Los resultados de viabilidad celular tras los tratamientos con enzalutamida y radioterapia concuerdan con los obtenidos en los dos estudios similares que se publicaron simultáneamente a la realización de esta tesis doctoral (207,208). Estos dos estudios utilizaron ensayos de punto final como método de medida de letalidad celular, en contraste con nuestro método de evaluación a tiempo real. Cabe destacar que los resultados de los tres estudios incluyendo el nuestro son equiparables. Por lo tanto, concluimos que los métodos basados en monitorización de células a tiempo real de tipo XCelligence RTCA son fiables, específicamente para estudiar la radiosensibilidad de enzalutamida en líneas celulares.

Nuestros datos de RTCA confirmaron las IC50 de Enzalutamida para células LNCaP estimadas por otros autores utilizando ensayos basados en punto final (232-233) así como la resistencia intrínseca a enzalutamida de PC-3, ya que su valor no se obtuvo en el experimento y tuvo que ser extrapolado a un valor no fisiológico. Encontramos que las células LNCaP y PC-3 exhibían una fuerte resistencia a la radioterapia según los datos de RTCA, en contraposición a otras líneas celulares donde el empleo de radioterapia a dosis menores consigue frenar su crecimiento e incluso hacerlas inviables destruyéndolas (234-236). Nuestros primeros experimentos con dosis bajas sobre estas líneas celulares no modificaron ni el crecimiento ni su viabilidad por lo que tuvimos que emplear sesiones únicas de radioterapia de 10, 20 y 30 Gy, mucho mayores a las aplicadas normalmente

sobre líneas celulares. De hecho, las células PC-3 permanecieron viables incluso con la dosis de irradiación más alta probada en este estudio (30 Gy). Por su parte, las células LNCaP solo murieron con esta dosis muy alta.

Curiosamente, un breve tratamiento previo con enzalutamida de las células LNCaP a la concentración IC50 de enzalutamida las sensibilizó fuertemente a la radioterapia, lo que indujo la muerte celular por apoptosis a la dosis más baja probada en este estudio (10 Gy). No ocurrió así en la línea celular PC3; ya que estas células permanecieron insensibles a la irradiación en presencia de enzalutamida.

La aplicación de esquemas de radioterapia hipofraccionados (empleando dosis por sesión mayores al fraccionamiento habitual de 1,8-2 Gy por fracción) es ya práctica clínica habitual en muchos de los hospitales de todo el mundo (237-240). Estudios recientes han evaluado la eficacia de hipofraccionamientos extremos o técnicas de esteroataxia (SBRT) en cáncer de próstata primario (241-243) y se están investigando en el contexto de enfermedad oligometastática (244-246). Las dosis utilizadas en la presente tesis doctoral, y en fraccionamiento único se asemejan más a estos fraccionamientos emergentes empleados en cáncer de próstata. Debido a las características radiobiológicas del órgano y su bajo cociente alfa/beta (247-249), la aplicación de estos esquemas hipofraccionados permite acortar tiempos de tratamiento aplicando dosis mayores de radioterapia por sesión sin que ello suponga un menor control en términos de supervivencia o control tumoral y sin un aumento de toxicidad significativo. De hecho, la braquiterapia es un claro ejemplo de hipofraccionamiento extremo y, debido a sus excelentes resultados (250-253), su empleo en cáncer de próstata es práctica clínica habitual ya sea en monoterapia o en combinación con radioterapia externa, según estadio clínico (108,112).

Por tanto, si la utilización de fraccionamientos más moderados o el uso en sesión única de altas dosis de radioterapia en líneas celulares de cáncer de próstata, en conjunción con enzalutamida, produce mayor o menor efecto letal en estas células es algo que debería explorarse de cara a poder investigar, a posteriori, estas combinaciones en práctica clínica habitual.



## 7. CONCLUSIONES

1. Enzalutamida es un potente radiosensibilizador en las células de cáncer de próstata hormonodependientes. La combinación de ambos tratamientos tiene un efecto sinérgico ya que se ha demostrado cómo esta combinación disminuye el crecimiento celular y proliferación en estas líneas celulares hormonodependientes tratadas con enzalutamida antes de radioterapia frente a aquellas que no fueron pretratadas con enzalutamida.
2. Las propiedades pro-apoptóticas de enzalutamida son necesarias para sus efectos de radiopotenciación en las células sensibles al bloqueo androgénico. La combinación de enzalutamida y radioterapia favorece la muerte por apoptosis en las células de cáncer de próstata hormonodependientes.
3. Los resultados utilizando la monitorización de la viabilidad celular a tiempo real son equiparables a los obtenidos en estudios con técnicas de referencia publicados por otros autores. La técnica RTCA supone un método simple y directo para evaluar la muerte celular por radioterapia en combinación con otras armas farmacológicas.
4. La combinación de radioterapia con enzalutamida representa una buena base teórica para el tratamiento del cáncer de próstata localizado. Los resultados de investigación básica obtenidos en la presente tesis doctoral apoyan los ensayos clínicos en curso investigando esta nueva opción de tratamiento para pacientes con cáncer de próstata en estadios localizados en lugar del uso limitado actual de enzalutamida en la enfermedad avanzada.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. ARCI: OMS; [último acceso el 25/09/18]. Accesible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
2. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018 Sep; 362:k3519.
3. Delongchamps NB, Singh A, Haas GP. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control* 2006; 13(3):158-168.
4. Baquet CR, Horm JW, Gibbs T, Greenwald P. Socioeconomic factors and cancer incidence among blacks and whites. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(8):551-557.
5. Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK, Henderson BE, Kolonel LN, Crocitto L, et al. Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res*. 1998; 58(8):1620–1623.
6. Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer*. 2000; 92(24):2009–2017.
7. Parker PM, Rice KR, Sterbis JR, Chen Y, Cullen J, McLeod DG, et al. Prostate cancer in men less than the age of 50: a comparison of race and outcomes. *Urology* 2011; 78 (1):110-115.
8. Hoffman RM, Gilliland FD, Eley JW, Harlan LC, Stephenson RA, Stanford JL, et al. Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(5):388-395.
9. Cross CK, Shultz D, Malkowicz SB, Huang WC, Whittington R, Tomaszewski JE, et al. Impact of race on prostate-specific antigen outcome after radical prostatectomy for clinically localized adenocarcinoma of the prostate. *J Clin Oncol* 2002; 20 (12):2863-2868.

10. Mahal BA, Aizer AA, Ziehr DR, Hyatt AS, Sammon JD, Schmid M, et al. Trends in disparate treatment of African American men with localized prostate cancer across National Comprehensive Cancer Network risk groups. *Urology* 2014; 84(2):386-392.
11. Hamilton RJ, Aronson WJ, Presti JC Jr, Terris MK, Kane CJ, Amling CL, et al. Race, biochemical disease recurrence, and prostate-specific antigen doubling time after radical prostatectomy: results from the SEARCH database. *Cancer* 2007; 110(10):2202-2209.
12. Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Lin Y, DiPaola RS, Yao SL. Fifteen-year Outcomes Following Conservative Management Among Men Aged 65 Years or Older with Localized Prostate Cancer. *Eur Urol* 2015; 68(5):805-811.
13. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2012; 106 (10):1697-1701.
14. Helgason H, Rafnar T, Olafsdottir HS, Jonasson JG, Sigurdsson A, Stacey SN, et al. Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. *Nat Genet* 2015; 47(8):906-910.
15. Hale V, Weischer M, Park JY. CHEK2 (\*) 1100delC Mutation and Risk of Prostate Cancer. *Prostate Cancer* 2014; 2014:294575.
16. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 2006; 38(6):652-658.
17. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(38):14068-14073.
18. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet* 2007; 39(5):631-637.
19. Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, et al. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. *Nat Genet* 2007; 39(5):638-644.
20. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39(8):977-983.

21. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, et al. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(9):910-919.
22. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40(3):316-321.
23. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 2008; 40(3):310-315.
24. Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Purcell LD, Gao Z, et al. Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat Genet* 2008; 40(19):1153-1155.
25. Schulman CC, Ekane S, Zlotta AR. Nutrition and prostate cancer: evidence or suspicion? *Urology* 2001; 58(3):318-334.
26. Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol* 2005; 23(32):8152-8160.
27. Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(5):414-428.
28. Colli JL, Colli A. International comparisons of prostate cancer mortality rates with dietary practices and sunlight levels. *Urol Oncol* 2006; 24(3):184-194.
29. Sinha R, Park Y, Graubard BI, Leitzmann MF, Hollenbeck A, Schatzkin A, et al. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J Epidemiol* 2009; 170(9):1165-1177.
30. Gann PH, Hennekens CH, Sacks FM, Grodstein F, Giovannucci EL, Stampfer MJ, et al. Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(4):281-286.
31. Allen NE, Key TJ, Appleby PN, Travis RC, Roddam AW, Tjønneland A, et al. Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer* 2008; 98(9):1574-581.
32. Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(1):61-68.
33. Kirsh VA, Peters U, Mayne ST, Subar AF, Chatterjee N, Johnson CC, et al. Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(15):1200-1209.

34. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(5):391-398.
35. Peters U, Leitzmann MF, Chatterjee N, Wang Y, Albanes D, Gelmann EP, et al. Serum lycopene, other carotenoids, and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(5):962-968.
36. Kristal AR, Till C, Platz EA, Song X, King IB, Neuhaus ML, et al. Serum lycopene concentration and prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(4):638-646.
37. Zu K, Mucci L, Rosner BA, Clinton SK, Loda M, Stampfer MJ, et al. Dietary lycopene, angiogenesis, and prostate cancer: a prospective study in the prostate-specific antigen era. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(2): djt430.
38. Jacobsen BK, Knutsen SF, Fraser GE. Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 1998; 9(6):553-557.
39. Kurahashi N, Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S. Plasma isoflavones and subsequent risk of prostate cancer in a nested case-control study: the Japan Public Health Center. *J Clin Oncol* 2008; 26(36):5923-5929.
40. Yan L, Spitznagel EL. Meta-analysis of soy food and risk of prostate cancer in men. *Int J Cancer* 2005; 117(4):667-669.
41. Brasky TM, Till C, White E, Neuhaus ML, Song X, Goodman P, et al. Serum phospholipid fatty acids and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 2011; 173(12):1429-1439.
42. Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(15):1132-1141.
43. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001; 85(11):1700-1705.
44. Downer MK, Kenfield SA, Stampfer MJ, Wilson KM, Dickerman BA, Giovannucci EL, et al. Alcohol Intake and Risk of Lethal Prostate Cancer in the Health Professionals Follow-Up Study. *J Clin Oncol* 2019; 37(17):1499-1511.

45. Wilson KM, Kasperzyk JL, Rider JR, Kenfield S, van Dam RM, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(11):876-884.
46. Lawson KA, Wright ME, Subar A, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A, et al. Multivitamin use and risk of prostate cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(10):754-764.
47. Stevens VL, McCullough ML, Diver WR, Rodriguez C, Jacobs EJ, Thun MJ, et al. Use of multivitamins and prostate cancer mortality in a large cohort of US men. *Cancer Causes Control* 2005; 16(6):643-650.
48. Price AJ, Travis RC, Appleby PN, Albanes D, Barricarte Gurrea A, Bjørge T, et al. Circulating Folate and Vitamin B12 and Risk of Prostate Cancer: A Collaborative Analysis of Individual Participant Data from Six Cohorts Including 6875 Cases and 8104 Controls. *Eur Urol* 2016; 70(6):941-951.
49. Allen NE, Travis RC, Appleby PN, Albanes D, Barnett MJ, Black A, et al. Selenium and Prostate Cancer: Analysis of Individual Participant Data From Fifteen Prospective Studies. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108 (11):djw153.
50. Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 2011; 306(14):1549-1556.
51. Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu K, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci EL. Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(13):1004-1007.
52. Zhang Y, Coogan P, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. Vitamin and mineral use and risk of prostate cancer: the case-control surveillance study. *Cancer Causes Control* 2009; 20(5):691-698.
53. Giovannucci E, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective study of calcium intake and incident and fatal prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(2):203-210.
54. Ma J, Stampfer MJ, Gann PH, Hough HL, Giovannucci E, Kelsey KT, et al. Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(5):385-390.

55. Gao X, LaValley MP, Tucker KL. Prospective studies of dairy product and calcium intakes and prostate cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(23):1768-1777.
56. Mitrou PN, Albanes D, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, et al. A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). *Int J Cancer* 2007; 120(11):2466-2473.
57. Severi G, English DR, Hopper JL, Giles GG. Re: Prospective studies of dairy product and calcium intakes and prostate cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(11):794-795.
58. Koh KA, Sesso HD, Paffenbarger RS Jr, Lee IM. Dairy products, calcium and prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2006; 95(11):1582-1585.
59. Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res* 1990; 10(5A):1307-1311.
60. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P, et al. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control* 2000; 11(9):847-852.
61. Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M, Lumme S, Jellum E, Hallmans G, et al. Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Int J Cancer* 2004; 108(1):104-108.
62. Islami F, Moreira DM, Boffetta P, Freedland SJ. A systematic review and meta-analysis of tobacco use and prostate cancer mortality and incidence in prospective cohort studies. *Eur Urol* 2014; 66(6):1054-1064.
63. Foerster B, Pozo C, Abufaraj M, Mari A, Kimura S, D'Andrea D, et al. Association of Smoking Status With Recurrence, Metastasis, and Mortality Among Patients With Localized Prostate Cancer Undergoing Prostatectomy or Radiotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2018; 4(7):953-961.
64. Endogenous Hormones and Prostate Cancer Collaborative Group, Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ, et al. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(3):170-183.
65. Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ, Ferrucci L, Carter HB, et al. Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann Intern Med* 2008; 149(7):461-471.

66. Hsing AW, Chua S Jr, Gao YT, Gentschein E, Chang L, Deng J, et al. Prostate cancer risk and serum levels of insulin and leptin: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(10):783-789.
67. Hsing AW, Gao YT, Chua S Jr, Deng J, Stanczyk FZ, et al. Insulin resistance and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(4):67-71.
68. Albanes D, Weinstein SJ, Wright ME, Männistö S, Limburg PJ, Snyder K, et al. Serum insulin, glucose, indices of insulin resistance, and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(18):1272-1279.
69. Hubbard JS, Rohrmann S, Landis PK, Metter EJ, Muller DC, Andres R, et al. Association of prostate cancer risk with insulin, glucose, and anthropometry in the Baltimore longitudinal study of aging. *Urology* 2004; 63(2):253-258.
70. MacInnis RJ, English DR. Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* 2006; 17(8):989-1003.
71. Allott EH, Masko EM, Freedland SJ. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur Urol* 2013; 63(5):800-809.
72. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371(9612):569-578.
73. Cao Y, Ma J. Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(4):486-501.
74. Parker AS, Thiel DD, Bergstralh E, Carlson RE, Rangel LJ, Joseph RW, et al. Obese men have more advanced and more aggressive prostate cancer at time of surgery than non-obese men after adjusting for screening PSA level and age: results from two independent nested case-control studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16(4):352-356.
75. Giovannucci EL, Liu Y, Leitzmann MF, Stampfer MJ, Willett WC. et al. A prospective study of physical activity and incident and fatal prostate cancer. *Arch Intern Med* 2005; 165(9):1005-1010.
76. Theoret MR, Ning YM, Zhang JJ, Justice R, Keegan P, Pazdur R. The risks and benefits of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors for prostate-cancer prevention. *N Engl J Med* 2011; 365(2):97-99.

77. Perletti G, Monti E, Magri V, Cai T, Cleves A, Trinchieri A, et al. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch Ital Urol Androl* 2017; 89(4):259-265.
78. Hung SC, Lai SW, Tsai PY, Chen PC, Wu HC, Lin WH, et al. Synergistic interaction of benign prostatic hyperplasia and prostatitis on prostate cancer risk. *Br J Cancer* 2013; 108(9):1778-1783.
79. Rybicki BA, Kryvenko ON, Wang Y, Jankowski M, Trudeau S, Chitale DA, et al. Racial differences in the relationship between clinical prostatitis, presence of inflammation in benign prostate and subsequent risk of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2016; 19(2):145-150.
80. Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, Chang TH, Gaydos CA, Zenilman JM, et al. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(5):939-945.
81. Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, Giovannucci EL, et al. Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(20):1406-1411.
82. Zafar MB, Terris MK. Prostate cancer detection in veterans with a history of Agent Orange exposure. *J Urol* 2001; 166(1):100-103.
83. Shah SR, Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, Presti JC Jr, Amling CL, et al. Exposure to Agent Orange is a significant predictor of prostate-specific antigen (PSA)-based recurrence and a rapid PSA doubling time after radical prostatectomy. *BJU Int* 2009; 103(9):1168-1172.
84. Chamie K, De Vere White RW, Lee D, Ok JH, Ellison LM. Agent Orange exposure, Vietnam War veterans, and the risk of prostate cancer. *Cancer* 2008; 113(9):2464-2470.
85. Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, et al. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(21):3457-3462.
86. Lobaccaro JM, Trousson A. Environmental estrogen exposure during fetal life: a time bomb for prostate cancer. *Endocrinology* 2014; 155(3):656-658.
87. Jacobs EJ, Rodriguez C, Mondul AM, Connell CJ, Henley SJ, Calle EE, et al. A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(13):975-980.

88. Dasgupta K, Di Cesar D, Ghosn J, Rajan R, Mahmud S, Rahme E. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer occurrence. *Cancer J* 2006; 12(2):130-135.
89. Salinas CA, Kwon EM, FitzGerald LM, Feng Z, Nelson PS, Ostrander EA, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory medications in relation to prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 2010; 172(5):578-590.
90. Huang TB, Yan Y, Guo ZF, Zhang XL, Liu H, Geng J, et al. Aspirin use and the risk of prostate cancer: a meta-analysis of 24 epidemiologic studies. *Int Urol Nephrol* 2014; 46(9):1715-1728.
91. Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(24):1819-1825.
92. Yu O, Eberg M, Benayoun S, Aprikian A, Batist G, Suissa S, et al. Use of statins and the risk of death in patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32(1):5-11.
93. Raval AD, Thakker D, Negi H, Vyas A, Salkini MW. Association between statins and clinical outcomes among men with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2016; 19(2):222.
94. Mucci LA, Kantoff PW. Is the Evidence Sufficient to Recommend Statins for All Men With Prostate Cancer? *J Clin Oncol* 2017; 35(29):3272-3274.
95. Jacobs EJ, Anderson RL, Stevens VL, Newton CC, Gansler T, Gapstur SM. Vasectomy and Prostate Cancer Incidence and Mortality in a Large US Cohort. *J Clin Oncol* 2016; 34(32):3880-3885.
96. Bhindi B, Wallis CJD, Nayan M, Farrell AM, Trost LW, Hamilton RJ, et al. The Association Between Vasectomy and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2017; 177(9):1273-1286.
97. Giles GG, Severi G, English DR, McCredie MR, Borland R, Boyle P, et al. Sexual factors and prostate cancer. *BJU Int* 2003; 92(3):211-216.
98. Rider JR, Wilson KM, Sinnott JA, Kelly RS, Mucci LA, Giovannucci EL. Ejaculation frequency and risk of prostate cancer: updated results with an additional decade of follow-up. *Eur Urol* 2016; 70(6):974-982.
99. Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 2002; 13(1):72-79.

100. Luscombe CJ, Fryer AA, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, et al. Exposure to ultraviolet radiation: association with susceptibility and age at presentation with prostate cancer. *Lancet* 2001; 358(9282):641-642.
101. Tuohimaa P, Pukkala E, Scélo G, Olsen JH, Brewster DH, Hemminki K, et al. Does solar exposure, as indicated by the non-melanoma skin cancers, protect from solid cancers: vitamin D as a possible explanation. *Eur J Cancer* 2007; 43(11):1701-1712.
102. Myles P, Evans S, Lophatananon A, Dimitropoulou P, Easton D, Key T, et al. Diagnostic radiation procedures and risk of prostate cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(11):1852-1856.
103. Hoffman KE, Hong TS, Zietman AL, Russell AH. External beam radiation treatment for rectal cancer is associated with a decrease in subsequent prostate cancer diagnosis. *Cancer* 2008; 112(4):943-949.
104. Willett CG, Zietman AL, Shipley WU, Coen JJ. The effect of pelvic radiation therapy on serum levels of prostate specific antigen. *J Urol* 1994; 151(6):1579-1581.
105. Zietman AL, Zehr EM, Shipley WU. The long-term effect on PSA values of incidental prostatic irradiation in patients with pelvic malignancies other than prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43(4):715-718.
106. Barry MJ, Nelson JB. Patients Present with More Advanced Prostate Cancer since the USPSTF Screening Recommendations. *J Urol* 2015; 194(6):1534-1536.
107. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(3):245-253.
108. NCCN clinical practice guidelines in oncology. [Internet]. Pennsylvania, EEUU: National Comprehensive Cancer Network (NCCN); 2020 [actualizado 21 may 2020; citado 06 june 2020]. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf)
109. Klein EA, Santiago-Jiménez M, Yousefi K, Robbins BA, Schaeffer EM, Trock BJ, et al. Molecular Analysis of Low Grade Prostate Cancer Using a Genomic Classifier of Metastatic Potential. *J Urol* 2017; 197(1):122-128.
110. Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR. The CAPRA-S score: A straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. *Cancer* 2011; 117(22):5039-5046.

111. Bekelman JE, Rumble RB, Chen RC, Pisansky TM, Finelli A, Feifer A, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of an American Urological Association/American Society for Radiation Oncology/Society of Urologic Oncology Guideline. *J Clin Oncol* 2018; 36(32):3251-3258.
112. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis and local treatment with curative intent. *Eur Urol.* 2016; 71(4):618-629
113. Henríquez I, Rodríguez-Antolín A, Cassinello J, Gonzalez San Segundo C, Unda M, Gallardo E, et al. Consensus statement on definition, diagnosis, and management of high-risk prostate cancer patients on behalf of the Spanish Groups of Uro-Oncology Societies URONCOR, GUO, and SOGUG. *Clin Transl Oncol.* 2018 Mar 7; 20(3):392–401.
114. Perera M, Papa N, Christidis D, Wetherell D, Hofman MS, Murphy DG, et al. Sensitivity, specificity, and predictors of positive 68 Ga-prostate-specific-membrane antigen positron emission tomography in Advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol.* 2016; 70(6): 926-937
115. M.B. Amin, S.B. Edge, F.L. Greene, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* (ed. 8), Springer, Cham, Switzerland (2017)
116. van der Kwast TH, Amin MB, Billis A, Epstein JI, Griffiths D, Humphrey PA, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working Group 2: T2 substaging and prostate cancer volume. *Mod Pathol.* 2011; 24(1):16–25.
117. Walz J, Chun FK, Klein EA, Reuther A, Saad F, Graefen M, et al. Nomogram predicting the probability of early recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 2009; 181(2):601-607.
118. <https://www.mskcc.org/cancer-care/adult/prostate/prediction-tools> (Accessed on October 13, 2019).
119. Gabriele D, Jereczek-Fossa BA, Krenkli M, Garibaldi E, Tessa M, Moro G, et al. Beyond D'Amico risk classes for predicting recurrence after external beam radiotherapy for prostate cancer: the Candiolo classifier. *Radiat Oncol* 2016; 11:23.
120. Leyh-Bannurah SR, Dell'Oglio P, Zaffuto E, Briganti A, Schiffmann J, Pompe RS, et al. Assessment of Oncological Outcomes After Radical Prostatectomy According to Preoperative and Postoperative Cancer of the Prostate Risk Assessment

- Scores: Results from a Large, Two-center Experience. *Eur Urol Focus* 2019; 5(4):568-576.
121. Thurtle DR, Greenberg DC, Lee LS, Huang HH, Pharoah PD, Gnanapragasam VJ. Individual prognosis at diagnosis in nonmetastatic prostate cancer: Development and external validation of the PREDICT Prostate multivariable model. *PLoS Med* 2019; 16(3):e1002758.
  122. Beesley LJ, Morgan TM, Spratt DE, Singhal U, Feng FY, Furgal AC, et al. Individual and Population Comparisons of Surgery and Radiotherapy Outcomes in Prostate Cancer Using Bayesian Multistate Models. *JAMA Netw Open* 2019; 2(2):e187765.
  123. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, Chen RC, Crispino T, Fontanarosa J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part I: Risk Stratification, Shared Decision Making, and Care Options. *J Urol* 2018; 199(3):683-690.
  124. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, Chen RC, Crispino T, Fontanarosa J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part II: Recommended Approaches and Details of Specific Care Options. *J Urol* 2018; 199(4):990-997.
  125. Tourinho-Barbosa RR, Sanchez-Salas R, Claros OR, Collura-Merlier S, Bakavicius A, Carneiro A, et al. Focal Therapy for Localized Prostate Cancer with Either High Intensity Focused Ultrasound or Cryoablation: A Single Institution Experience. *J Urol*. 2020; 203(2):320-330.
  126. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(15):1415-1424.
  127. Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, et al. Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(15):1425-1437.
  128. Kishan AU, Cook RR, Ciezki JP, Ross AE, Pomerantz MM, Nguyen PL, et al. Radical Prostatectomy, External Beam Radiotherapy, or External Beam Radiotherapy With Brachytherapy Boost and Disease Progression and Mortality in Patients With Gleason Score 9-10 Prostate Cancer. *JAMA* 2018; 319(9):896-905.

129. O'Shaughnessy MJ, McBride SM, Vargas HA, Touijer KA, Morris MJ, Danila DC, et al. A Pilot Study of a Multimodal Treatment Paradigm to Accelerate Drug Evaluations in Early-stage Metastatic Prostate Cancer. *Urology* 2017; 102:164-172.
130. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 377(4):352-360
131. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med.* 2017; 377(4):338-351.
132. Hoyle AP, Ali A, James ND, Cook A, Parker CC, de Bono JS, et al. Abiraterone in "High-" and "Low-risk" Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2019; 76(6):719-728
133. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2019; 381(1):13-24.
134. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2019; 381(2):121-131.
135. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2015; 373(8):737-746.
136. Gravis G1, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14(2):149-58.
137. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet.* 2016; 387 (10024):1163-1177.
138. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2018; 392(10162):2353-2366.

139. Deorah S, Rao MB, Raman R, Gaitonde K, Donovan JF. Survival of patients with small cell carcinoma of the prostate during 1973-2003: a population-based study. *BJU Int* 2012; 109(6):824-830.
140. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2011; 65(11):1180–1192.
141. Fitzpatrick JM, Bellmunt J, Fizazi K, Heidenreich A, Sternberg CN, Tombal B, et al. Optimal management of metastatic castration-resistant prostate cancer: highlights from a European Expert Consensus Panel. *Eur J Cancer*. 2014; 50(9):1617–27.
142. Alcaraz A, Martínez-Pineiro L, Rodríguez A, Rubio J, Borque A, Burgos J, et al. Consensus on castration-resistant prostate cancer management in Spain. *Arch Esp Urol*. 2017; 70(9):777–91
143. Gómez-Caamaño A, González-San Segundo C, Henríquez I, Maldonado X, Zapatero A; Expert Panel for the Consensus on Management of Castration-Resistant Prostate Cancer 2017, Urological Tumours Working Group (URONCOR), Spanish Society of Radiation Oncology (SEOR). Consensus on management of castration-resistant prostate cancer on behalf of the Urological Tumours Working Group (URONCOR) of the Spanish Society of Radiation Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2019; 21(4):420–432.
144. Virgo KS, Basch E, Loblaw DA, Oliver TK, Rumble RB, Carducci MA, et al. Second-Line Hormonal Therapy for Men With Chemotherapy-Naïve, Castration-Resistant Prostate Cancer: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *J Clin Oncol* 2017; 35(17):1952–1964.
145. Taylor CD, Elson P, Trump DL. Importance of continued testicular suppression in hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11(11):2167-2172.
146. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011; 364(21):1995-2005.
147. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *N Engl J Med* 2013; 368(2):138-148.
148. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012; 367(13):1187-1197.

149. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014; 371(5):424-433.
150. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2018; 378 (15):1408-1418.
151. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2018; 378(26):2465-2474.
152. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2019; 380(13):1235-1246.
153. Morris MJ, Heller G, Bryce AH, Armstrong AJ, Beltran H, Hahn OM, et al. Alliance A031201: A phase III trial of enzalutamide (ENZ) versus enzalutamide, abiraterone, and prednisone (ENZ/AAP) for metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) (abstract). *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl; abstr 5008). Abstract available online at <https://meetinglibrary.asco.org/record/172903/abstract> (Accessed on March 21, 2020).
154. Loriot Y, Bianchini D, Ileana E, Sandhu S, Patrikidou A, Pezaro C, et al. Antitumour activity of abiraterone acetate against metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel and enzalutamide (MDV3100). *Ann Oncol* 2013; 24(7):1807-1812.
155. Bianchini D, Lorente D, Rodriguez-Vida A, Omlin A, Pezaro C, Ferraldeschi R, et al. Antitumour activity of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) pre-treated with docetaxel and abiraterone. *Eur J Cancer* 2014; 50(1):78-84.
156. Khalaf DJ, Annala M, Taavitsainen S, Finch DL, Oja C, Vergidis J, et al. Optimal Sequencing of Enzalutamide and Abiraterone Acetate Plus Prednisone in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 2, Crossover Trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(12):1730-1739.
157. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(5):411-422.

158. Geary SM, Salem AK. Prostate cancer vaccines: Update on clinical development. *Oncoimmunology*. 2013; 2(5):e24523-8.
159. Gulley JL, Borre M, Vogelzang NJ, Ng S, Agarwal N, Parker CC, et al. Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2019; 37(13):1051-1061.
160. Higano C, Saad F, Somer B, Curti B, Petrylak DP, Drake CG, et al. A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer vs docetaxel plus prednisone in asymptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Genitourinary Cancer Symposium: Proc Am Soc Clin Oncol*, 2009:Abstract # LBA150
161. Schweizer MT, Antonarakis ES, Bismar TA, Guedes LA, Cheng HH, Tretiakova MS, et al. Genomic Characterization of Prostatic Ductal Adenocarcinoma Identifies a High Prevalence of DNA Repair Gene Mutations. *JCO Precis Oncol* 2019; 3:1-9.
162. Antonarakis ES, Shaikat F, Isaacsson Velho P, Kaur H, Shenderov E, Pardoll DM, et al. Clinical Features and Therapeutic Outcomes in Men with Advanced Prostate Cancer and DNA Mismatch Repair Gene Mutations. *Eur Urol* 2019; 75(3):378-382.
163. Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA, et al. Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol* 2019; 5(4):471-478.
164. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol* 2019; 37(4):286-295.
165. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 2008; 26(2):242-245.
166. Basch EM, Somerfield MR, Beer TM, Carducci MA, Higano CS, A Hussain MH, et al. American Society of Clinical Oncology endorsement of the Cancer Care Ontario Practice Guideline on nonhormonal therapy for men with metastatic hormone-refractory (castration-resistant) prostate cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(33):5313-5318.
167. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010; 376(9747):1147-1154.

168. Oudard S, Fizazi K, Sengelov L, Daugaard G, Saad F, Hansen S, et al. Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *J Clin Oncol* 2017; 35(28):3189-3197.
169. Berry W, Dakhil S, Modiano M, Gregurich M, Asmar L. Phase III study of mitoxantrone plus low dose prednisone versus low dose prednisone alone in patients with asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 2002; 168(6):2439-2443.
170. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996; 14(6):1756-1764.
171. Sandhu SK, Omlin A, Hylands L, Miranda S, Barber LJ, Riisnaes R, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of advanced germline BRCA2 mutant prostate cancer. *Ann Oncol* 2013(5); 24:1416-1418.
172. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2020; 382(22):2091-2102.
173. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2013; 369(3):213-223.
174. Smith M, Parker C, Saad F, Miller K, Tombal B, Ng QS, et al. Addition of radium-223 to abiraterone acetate and prednisone or prednisolone in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases (ERA 223): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019; 20(3):408-419.
175. Suzuki H, Okihara K, Miyake H, Fujisawa M, Miyoshi S, Matsumoto T, et al. Alternative nonsteroidal antiandrogen therapy for advanced prostate cancer that relapsed after initial maximum androgen blockade. *J Urol* 2008(3); 180:921-927.
176. Small EJ, Halabi S, Dawson NA, Stadler WM, Rini BI, Picus J, et al. Antiandrogen withdrawal alone or in combination with ketoconazole in androgen-independent prostate cancer patients: a phase III trial (CALGB 9583). *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1025-1033.
177. Fosså SD, Slee PH, Brausi M, Horenblas S, Hall RR, Hetherington JW, et al. Flutamide versus prednisone in patients with prostate cancer symptomatically

- progressing after androgen-ablative therapy: a phase III study of the European organization for research and treatment of cancer genitourinary group. *J Clin Oncol* 2001; 19(1):62-71.
178. Venkitaraman R, Lorente D, Murthy V, Thomas K, Parker L, Ahiabor R, et al. A randomised phase 2 trial of dexamethasone versus prednisolone in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 67(4):673-679.
  179. Small EJ, Meyer M, Marshall ME, Reyno LM, Meyers FJ, Natale RB, et al. Suramin therapy for patients with symptomatic hormone-refractory prostate cancer: results of a randomized phase III trial comparing suramin plus hydrocortisone to placebo plus hydrocortisone. *J Clin Oncol* 2000; 18(7):1440-1450.
  180. Manikandan R, Srirangam SJ, Pearson E, Brown SC, O'Reilly P, Collins GN. Diethylstilboestrol versus bicalutamide in hormone refractory prostate carcinoma: a prospective randomized trial. *Urol Int* 2005; 75(3):217-221.
  181. Geller J, Albert J, Geller S, Lopez D, Cantor T, Yen S. Effect of megestrol acetate (Megace) on steroid metabolism and steroid-protein binding in the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 43(5):1000-1008.
  182. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83(6): 835–839.
  183. Culig Z, Santer FR. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2014; 33(2-3):413-427.
  184. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009; 324(5928):787–790.
  185. Agencia Europea de Medicamentos [Internet]. Leiden, Países Bajos: Astellas Pharma Europe B.V; 2013 [actualizado 11 Mar 2020; citado 16 abr 2020]. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xtandi-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xtandi-epar-product-information_es.pdf)
  186. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, et al. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet*. 2010; 375(9724):1437-1446.
  187. Shore ND, Chowdhury S, Villers A, Klotz L, Siemens DR, Phung D, et al. Efficacy and safety of enzalutamide versus bicalutamide for patients with metastatic

- prostate cancer (TERRAIN): a randomised, double-blind, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016; 17(2):153-163.
188. Penson DF, Armstrong AJ, Concepcion R, Agarwal N, Olsson C, Karsh L, et al. Enzalutamide Versus Bicalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer: The STRIVE Trial. *J Clin Oncol.* 2016; 34(18):2098-2106.
  189. Xie W, Regan MM, Buyse M, Halabi S, Kantoff PW, Sartor O, et al. Metastasis-Free Survival Is a Strong Surrogate of Overall Survival in Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2017; 35(27):3097-3104.
  190. Sternberg CN, Fizazi K, Saad F, Shore ND, De Giorgi U, Penson DF, et al. PROSPER Investigators. Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2020; 382(23):2197-2206.
  191. Tombal B, Borre M, Rathenborg P, Werbrouck P, Van Poppel H, Heidenreich A, et al. Enzalutamide monotherapy in hormone-naïve prostate cancer: primary analysis of an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2014; 15(6):592-600.
  192. Tombal B, Borre M, Rathenborg P, Werbrouck P, Van Poppel H, Heidenreich A, et al, et al. Long-Term Antitumor Activity and Safety of Enzalutamide Monotherapy in Hormone Naïve Prostate Cancer: 3-Year Open Label Followup Results. *J Urol.* 2018; 199(2):459-464.
  193. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2019; 381(2):121-131.
  194. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2019; 37(32):2974-2986.
  195. Gandaglia G, Fossati N, Karnes RJ, Boorjian SA, Colicchia M, Bossi A, et al. Use of Concomitant Androgen Deprivation Therapy in Patients Treated With Early Salvage Radiotherapy for Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy: Long-term Results From a Large, Multi-institutional Series. *Eur Urol.* 2018; 73(4):512-518.
  196. Zapatero A, Guerrero A, Maldonado X, Alvarez A, Gonzalez C, Cabeza MA, et al. High-dose radiotherapy with short-term or long-term androgen deprivation in localised prostate cancer (DART01/05 GICOR): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(3): 320–327.

197. Lawton CAF, Lin X, Hanks GE, Lepor H, Grignon DJ, Brereton HD, et al. Duration of Androgen Deprivation in Locally Advanced Prostate Cancer: Long-Term Update of NRG Oncology RTOG 9202. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017; 98(2):296-303.
198. Zumsteg Z, Zelefsky P. Short-term androgen deprivation therapy for patients with intermediate-risk prostate cancer undergoing dose-escalated radiotherapy: the standard of care? *Lancet Oncol.* 2012; 13(6):259-269.
199. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrial.gov [Internet] U.S. National Library of Medicine; [citado 01 de may de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ENZALUTAMIDE+and+radiotherapy>
200. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrial.gov [Internet] U.S. National Library of Medicine; [citado 01 de may de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03196388>
201. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrial.gov [Internet] U.S. National Library of Medicine; [citado 01 de may de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01212991>
202. Bartek J, Mistrik M, Bartkova J. Androgen receptor signaling fuels DNA repair and radioresistance in prostate cancer. *Cancer Discov.* 2013; 3(11):1222–1224.
203. Tyrrell CJ, Payne H, See WA, McLeod DG, Wirth MP, Iversen P et al. Bicalutamide ('Casodex') 150mg as adjuvant to radiotherapy in patients with localized or locally advanced prostate cancer: results from the randomised Early Prostate Cancer Programme. *Radiother Oncol.* 2005; 76(1):4–10.
204. Gaudet M, Vigneault E, Foster W, Meyer F, Martin AG. Randomized non-inferiority trial of Bicalutamide and Dutasteride versus LHRH agonists for prostate volume reduction prior to I125 permanent implant brachytherapy for prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2016; 118(1):141–147.
205. Kahn B, Collazo J, Kyprianou N. Androgen receptor as a driver of therapeutic resistance in advanced prostate cancer. *Int J Biol Sci.* 2014; 10(6):588–595.
206. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene.* 2013; 32(49):5501–5511.

207. Ghashghaei M, Niazi TM, Heravi M, Bekerat H, Trifiro M, Paliouras M, et al. Enhanced radiosensitization of enzalutamide via schedule dependent administration to androgen-sensitive prostate cancer cells. *Prostate*. 2018; 78(1):64-75
208. Triggiani L, Colosini A, Buglione M, Pasinetti N, Orizio F, Bardoscia L, et al. Exploring the Role of Enzalutamide in Combination with Radiation Therapy: An In Vitro Study. *Anticancer Res*. 2018; 38(6):3487-3492.
209. Sak A, Stuschke M. Use of  $\gamma$ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 2010; 20(4):223-231.
210. Khanna K.K., Jackson S.P. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet*. 2001; 27(3):247–254.
211. Quero L, Giocanti N, Hennequin C, Favaudon V. Antagonistic interaction between bicalutamide (Casodex) and radiation in androgen-positive prostate cancer LNCaP cells. *Prostate*. 2010; 70(4):401–411.
212. Bromfield GP, Meng A, Warde P, Bristow RG. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2003; 6(1):73-85.
213. Goodwin JF, Schiewer MJ, Dean JL, Schrecengost RS, de Leeuw R, Han S, et al. A hormone-DNA repair circuit governs the response to genotoxic insult. *Cancer Discov*. 2013; 3(11):1254–1271.
214. See WA, Tyrrell CJ, CASODEX Early Prostate Cancer Trialists' Group. The addition of bicalutamide 150 mg to radiotherapy significantly improves overall survival in men with locally advanced prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132:S7–16.
215. Roach M 3rd, Thomas K. Overview of randomized controlled treatment trials for clinically localized prostate cancer: implications for active surveillance and the United States preventative task force report on screening? *J Natl Cancer Inst Monogr* 2012; 2012(45):221–229.
216. Roach M 3rd, Lu J, Pilepich MV, Asbell SO, Mohiuddin M, Terry R, et al. Predicting long-term survival, and the need for hormonal therapy: a meta-analysis of RTOG prostate cancer trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47(3):617–627.
217. Crook J, Ludgate C, Malone S, Perry G, Eapen L, Bowen J, et al. Final report of multicenter Canadian Phase III randomized trial of 3 versus 8 months of neoadjuvant androgen deprivation therapy before conventional-dose radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(2):327–333.

218. Armstrong JG, Gillham CM, Dunne MT, Fitzpatrick DA, Finn MA, Cannon ME, et al. A randomized trial (Irish clinical oncology research group 97-01) comparing short versus protracted neoadjuvant hormonal therapy before radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(1):35–45.
219. Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, John Matthews, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(5):451–459.
220. Pisansky T, Hunt D, Gomella LG, Amin MB, Balogh AG, Chinn DM, et al. Duration of androgen suppression before radiotherapy for localized prostate cancer: Radiation Therapy Oncology Group randomized clinical trial 9910. *J Clin Oncol* 2015; 33(4):332–339.
221. Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, et al. Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(24):2516–2527.
222. Hanks GE, Pajak TF, Porter A, Grignon D, Brereton H, Venkatesan V, et al. Phase III trial of long-term adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytoreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 92-02. *J Clin Oncol* 2003; 21:3972–3978.
223. Barrado M, Blanco-Luquin I, Navarrete PA, Visus I, Guerrero-Setas D, Escors D, et al. Radiopotential of enzalutamide over human prostate cancer cells as assessed by real-time cell monitoring. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2019; 24(2):221-226.
224. Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, Nelson CC, Chopin LK. Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines.G3 (Bethesda). 2017; 7(6):1731-1741.
225. Holzapfel K, Müller SA, Seidl C, Grosu AL, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Effects of irradiation on the [Methyl-3H] choline uptake in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC3. *Strahlenther Onkol.* 2008; 184(6):319-324.
226. Single A, Beetham H, Telford BJ, Guilford P, Chen A. A Comparison of Real-Time and Endpoint Cell Viability Assays for Improved Synthetic Lethal Drug Validation. *J Biomol Screen.* 2015; 20(10):1286-1293.

227. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17):5421-5426.
228. Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, et al. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One.* 2012; 7(10):e46536.
229. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 33–43.
230. Atienza JM, Yu N, Kirstein SL, Xi B, Wang X, Xu X, et al. Dynamic and label free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev Technol.* 2006; 4(5):597–607.
231. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, du Mez E, et al. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug responsiveness in Real Time. *Biosensors* 2015; 5(2):199-222.
232. Purushottamachar P, Godbole AM, Gediya LK, Martin MS, Vasaitis TS, Kwegyir-Afful AK, et al. Systematic structure modifications of multitarget prostate cancer drug candidate galeterone to produce novel androgen receptor down-regulating agents as an approach to treatment of advanced prostate cancer. *J Med Chem.* 2013; 56(12):4880-4898.
233. Jung ME, Ouk S, Yoo D, Sawyers CL, Chen C, Tran C, et al. Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Med Chem.* 2010; 53(7):2779-2796.
234. Naderi J, Samani F, Amooheidari A, Javanmard SH, Vahabzadeh G, Vaseghi G. Evaluation of effects of morphine and ionizing radiation in cancer cell lines. *J Cancer Res Ther.* 2019; 15(Supplement):S144-S152.
235. Rubner Y, Muth C, Strnad A, Derer A, Sieber R, Buslei R, et al. Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines. *Radiat Oncol.* 2014; 9(1):89.
236. Zhang GJ, Gao R, Zhang MX, Jin X, Liang P, Wang JS. [Dose effect of radiotherapy on drug resistance in esophageal cancer cell]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2010; 26(2):152-156.
237. Dearnaley D, Syndikus I, Mossop H, Khoo V, Birtle A, Bloomfield D, et al. Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy

- for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(8):1047-1060.
238. Catton CN, Lukka H, Gu CS, Martin JM, Supiot S, Chung PWM, et al. Randomized Trial of a Hypofractionated Radiation Regimen for the Treatment of Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2017; 35(17):1884-1890.
239. Lee WR, Dignam JJ, Amin MB, Bruner DW, Low D, Swanson GP, et al. Randomized Phase III Noninferiority Study Comparing Two Radiotherapy Fractionation Schedules in Patients With Low-Risk Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2016; 34(20):2325-2332.
240. Incrocci L, Wortel RC, Alemany WG, Aluwini S, Schimmel E, Krol S, et al. Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with localised prostate cancer (HYPRO): final efficacy results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(8):1061-1069.
241. Widmark A, Gunnlaugsson A, Beckman L, Thellenberg-Karlsson C, Hoyer M, Lagerlund M, et al. Ultra-hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the HYPO-RT-PC randomised non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet.* 2019; 394(10196):385–395.
242. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, et al. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet.* 2018; 392(10162):2353–2366.
243. Brand DH, Tree AC, Ostler P, van der Voet H, Loblaw A, Chu W, et al. Intensitymodulated fractionated radiotherapy versus stereotactic body radiotherapy for prostate cancer (PACE-B): acute toxicity findings from an international randomised, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(11):1531–43.
244. Conde-Moreno AJ, Lopez-Guerra JL, Macias VA, Vázquez de la Torre ML, Samper Ots P, San José-Maderuelo S, et al. Spanish Society of Radiation Oncology clinical guidelines for stereotactic body radiation therapy in lymph node oligometastases. *Clin Transl Oncol.* 2016; 18(4):342-351.
245. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet] U.S. National Library of Medicine; [citado 20 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02192788>

246. Ost P, Reynders D, Decaestecker K, Fonteyne V, Lumen N, De Bruycker A, et al. Surveillance or Metastasis-Directed Therapy for Oligometastatic Prostate Cancer Recurrence: A Prospective, Randomized, Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36(5):446-453.
247. Duchesne GM, Peters LJ. What is the alpha/beta ratio for prostate cancer? Rationale for hypofractionated high-dose-rate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 44(4):747-748.
248. Cosset JM, Mornex F, Eschwège F. Hypofractionnement en radiothérapie: l'éternel retour. *Cancer Radiother*. 2013; 17(5-6):355-362.
249. Brenner DJ, Hall EJ. Fractionation and protraction for radiotherapy of prostate carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 43(5):1095-101.
250. Morris WJ, Tyldesley S, Rodda S, Halperin R, Pai H, McKenzie M, et al. Androgen Suppression Combined with Elective Nodal and Dose Escalated Radiation Therapy (the ASCENDE-RT Trial): An Analysis of Survival Endpoints for a Randomized Trial Comparing a Low-Dose-Rate Brachytherapy Boost to a Dose-Escalated External Beam Boost for High- and Intermediate-risk Prostate Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017; 98(2):275-285.
251. Hoskin PJ, Rojas AM, Bownes PJ, Lowe GJ, Ostler PJ, Bryant L. Randomised trial of external beam radiotherapy alone or combined with high-dose-rate brachytherapy boost for localised prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2012; 103(2):217-22.
252. Sathya JR, Davis IR, Julian JA, Guo Q, Daya D, Dayes IS, et al. Randomized Trial Comparing Iridium Implant Plus External-Beam Radiation Therapy With External-Beam Radiation Therapy Alone in Node-Negative Locally Advanced Cancer of the Prostate. *J Clin Oncol*. 2005; 23(6):1192-1199.
253. Kee DLC, Gal J, Falk AT, Schiappa R, Chand ME, Gautier M, et al. Brachytherapy versus external beam radiotherapy boost for prostate cancer: Systematic review with meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev*. 2018; 70:265-271.